

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Obor: Biochemie a patobiochemie



Mgr. Jana Maixnerová

**Nové farmakologické intervence ovlivňující příjem potravy se zaměřením
na anorexigenní neuropeptidy: peptid CART (cocaine-and amphetamine-
regulated transcript) a peptid uvolňující prolaktin (PrRP)**

**New pharmacological interventions influencing food intake focused on
effects of CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) peptide
and prolactin-releasing peptide**

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Datum obhájení práce:

Praha 2010

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním depozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

Souhlasím – Nesouhlasím*

V Praze 22.07.2010

JANA MAIXNEROVÁ

Podpis

* Nehodící se škrtněte

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

MAIXNEROVÁ Jana: Nové farmakologické intervence ovlivňující příjem potravy se zaměřením na anorexigenní neuropeptidy: peptid CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) a peptid uvolňující prolaktin (PrRP); [New pharmacological interventions influencing food intake focused on effects of CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) peptide and prolactin-releasing peptide]. Praha 2010. 127 s., 4 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, lékařská fakulta, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.. Vedoucí práce RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

ABSTRAKT

Disertační práce je zaměřena na charakterizaci biologické aktivity dvou nedávno objevených anorexigenních neuropeptidů: peptidu CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) a peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP).

Strukturně-aktivitní studie fragmentů reprezentujících různé části CART(61-102) charakterizovala jak jejich vazbu k feochromocytomálním buňkám PC12, tak jejich schopnost ovlivnit příjem potravy. Výsledky ukázaly, že pro uchování biologické aktivity peptidu CART je nezbytná kompaktní struktura obsahující disulfidické můstky.

V druhé části práce byl prokázán synergistický účinek periferně podaného cholecystokininu (CCK) a centrálně podaného peptidu CART na příjem potravy u hladových myší. Anorexigenní účinek peptidu CART byl zvýšen podprahovou dávkou CCK, zatímco antagonist receptoru CCK₁ účinek blokoval.

Ve třetí části práce byl testován příjem potravy po simultánním podání orexigenního neuropeptidu Y s peptidem CART nebo CCK jak u štíhlých myší, tak u myší obézních po působení glutamátem sodným (MSG). U obézních MSG myší s lézemi v nucleu arcuatu bylo prokázáno, že anorexigenní účinek centrálně podaného peptidu CART zůstává zachován, zatímco periferně podaný CCK u těchto myší na příjem potravy nepůsobí z důvodu nefunkční signalizace leptinu.

V závěrečné části byla ve třech hypofyzárních buněčných liniích: potkaních buňkách GH3 a RC-4B/C a myších AtT-20 prokázána přítomnost receptoru pro PrRP a specifická vazba PrRP k těmto receptorům vykazovala K_d v nM oblasti. Zejména vhodná pro studium biologické aktivity PrRP31 a jeho zkrácených analogů se ukázala potkaní buněčná linie RC-4B/C.

Klíčová slova: peptid CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), peptid uvolňující prolaktin (PrRP), cholecystokinin (CCK), obezita, analogy

ABSTRACT

The thesis was focused on characterization of biological activities of two recently discovered anorexigenic neuropeptides: CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and prolactin-releasing peptide (PrRP).

In order to find a pharmacophore of CART peptide, shorter fragments of CART(61-102) peptide were tested for binding to PC12 cells and inhibition of food intake in fasted mice. The results showed that a compact structure of CART peptide containing three disulphide bridges is necessary for preservation of its full biological activity.

In the second part of the thesis, synergistic and long-lasting effect of centrally administered peptide CART and peripherally administered cholecystokinin (CCK) is described. In fasted C57BL/6 mice, the anorexigenic effect of CART was enhanced by a subthreshold dose of CCK, while CCK₁ receptor antagonist devazepide blocked the effect of CART peptide on food intake.

In the third part of the thesis, food intake in fed lean and MSG (monosodium-glutamate treated) obese male mice with lesions in nucleus arcuatus (ARC) was followed. Anorexigenic action of CART peptide was preserved but satiety effect of CCK was completely lost in MSG obese mice and therefore, effective leptin signaling in ARC is necessary for satiety effect of CCK.

Finally, the PrRP receptor was detected in three rodent tumor pituitary cell lines: rat GH3, mouse AtT-20, and rat RC-4B/C cells both with specific antibody and saturation binding of radioiodinated PrRP31 to intact cells. Biological effects of PrRP31 and its shorter analogs were demonstrated in RC-4B/C cells.

Key words: CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide, prolactin-releasing peptide (PrRP), cholecystokinin (CCK), obesity, analogs

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. za skvělé vedení během mého studia, za cenné rady, připomínky a komentáře k mé práci. Dále děkuji svému partnerovi Jindrovi a svým rodičům za jejich podporu a trpělivost při mých studiích, bez nich by tato práce nemohla vzniknout.

Dále bych ráda poděkovala dalším milým spolupracovníkům z našeho ústavu, kteří mi v průběhu práce pomáhali: Ing. Blance Železné, CSc., Mgr. Miloslavu Šandovi za měření hmotnostních spekter, Ing. Miroslavě Blechové za syntézu peptidů, Doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, CSc. za jodaci peptidů. Děkuji za spolupráci při podání látek do mozku RNDr. Renatě Haugvicové, CSc. (Chambon a.s.) a za provedení imunohistochemických experimentů Zdenovi Pirníkovi PhD a RNDr. Alexandrovi Kissovi, DrSc. (Ústav experimentální endokrinologie, SAV, Bratislava) a RNDr. Evě Šloncové za cenné rady s buněčnými kulturami (Ústav molekulární genetiky AV ČR v.v.i.).

V neposlední řadě bych ráda poděkovala naší skupině v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. a Dr. Jiřímu Jiráčkovi za vytvoření přátelského prostředí, ochotu pomoci a všestrannou podporu.

Tato práce byla provedena v rámci výzkumného záměru AV ČR Z40550506 a byla podporována granty GA ČR 303/05/0614, 305/060427 a P303/10/1368.

OBSAH	
PODĚKOVÁNÍ	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	12
1. ÚVOD	14
1.1. Obezita	14
1.1.1. Příčiny vzniku obezity	16
1.1.2. Nemoci spojené s obezitou	17
1.2. Regulace příjmu potravy	17
1.2.1. Centrální regulace příjmu potravy	17
1.2.2. Periferní regulace příjmu potravy	20
1.3. Dlouhodobé a krátkodobé působení peptidů ovlivňujících příjem potravy	22
1.3.1. Peptidy dlouhodobě působící	23
1.3.1.1. Leptin	23
1.3.1.2. Inzulín	26
1.3.1.3. Ghrelin	26
1.3.2. Peptidy krátkodobě působící	27
1.3.2.1. Cholecystokinin (CCK)	27
1.3.2.2. Neuropeptid Y (NPY)	28
1.4. Peptid CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)	30
1.4.1. Objev a výskyt	30
1.4.2. Struktura	30
1.4.3. Fyziologická úloha peptidu CART	32
1.4.3.1. Vliv peptidu CART a dalších látek na příjem potravy a jejich vzájemný vztah	32
1.4.3.2. Další účinky peptidu CART	34
1.4.4. Receptor pro peptidy CART a buněčná signalizace	34
1.4.5. Fragmenty peptidu CART	37
1.5. Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)	37
1.5.1. Objev a výskyt PrRP a receptor pro PrRP	37
1.5.2. Struktura	38
1.5.3. Fyziologická úloha PrRP	38
1.5.3.1. Vliv PrRP na regulaci příjmu potravy	40
1.5.4. PrRP a buněčná signalizace	40

1.5.5. Myši s vyřazeným genem pro PrRP či GPR10	41
1.5.6. PrRP a reakce na stres a bolest	42
1.5.7. Analogy PrRP	43
1.6. Modely myši obezity	43
1.6.1. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)	43
1.7. Buněčné linie	44
1.7.1. Feochromocytální buňky PC12	44
1.7.2. Hypofyzární buněčné linie (RC-4B/C, GH3 a AtT-20)	44
1.7.2.1. RC-4B/C	44
1.7.2.2. GH3	45
1.7.2.3. AtT-20	45
1.8. Vazebné experimenty	46
1.8.1. Teorie vazebných experimentů	46
1.8.2. Specifická, nespecifická a totální vazba	46
1.8.3. Saturační vazebné experimenty	47
1.8.4. Kompetitivní vazebné experimenty	47
 2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	 48
 3. MATERIÁL	 49
 4. METODY	 51
4.1. Peptidy CART a jejich fragmenty a peptidy PrRP	51
4.1.1. Jodace peptidu CART(61-102) a PrRP31	51
4.2. Pěstování buněčných linií	52
4.2.1. Pěstování buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20	52
4.2.2. Pěstování buněčné linie PC12	53
4.3. Izolace membrán z nediferencovaných buněk PC12	53
4.3.1. Stanovení množství bílkovin	53
4.4. Provedení vazebných experimentů	54
4.4.1. Optimalizace podmínek vazebných experimentů	54
4.4.2. Kompetitivní vazebné experimenty	54

4.4.2.1. Kompetitivní vazba peptidu CART(61-102) na buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12	54
4.4.2.2. Kompetitivní vazba na celé buňky PC12 na destičkách	55
4.4.2.3. Kompetitivní vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách	55
4.4.3. Saturační vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách	55
4.4.4. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika	56
4.5. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace	56
4.5.1. Sběr vzorků pro stanovení receptoru PrRP pomocí Western blotu u buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20	56
4.5.2. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace (pMAPK/ERK1/2, pCREB a pAkt) na buněčných liniích RC-4B/C a PC12	56
4.6. Metoda Western blot	57
4.6.1. SDS-PAGE	57
4.6.2. Přenos proteinů na PVDF membránu a nitrocelulózovou membránu	57
4.6.3. Detekce proteinů na PVDF membráně a nitrocelulózové membráně	58
4.7. Stanovení hormonů v mediu buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20	59
4.8. Experimentální zvířata a obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)	60
4.8.1. Odběr a hmotnost orgánů a krve/séra a biochemické stanovení	60
4.8.2. Histologie mozku	61
4.9. Stanovení příjmu potravy u myši	61
4.9.1. Zavedení ICV kanyl	61
4.9.2. IP a ICV podání látek	62
4.9.3. Test příjmu potravy	63
4.9.4. Výpočty a statistika	63
4.10. Imunohistochemie	65
4.10.1. Podání látek, perfuze a zpracování mozkové tkáně	65
4.10.2. Imunohistochemie a barvení	65
4.10.3. Vyhodnocení	66
4.11. Test pohybu ve volném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu „hot plate“	66
 5. VÝSLEDKY	 67
5.1. Buněčné linie	67

5.1.1. Buněčná linie PC12	67
5.1.1.1. Pěstování buněčné linie PC12	67
5.1.2. Růstová křivka buněk PC12	68
5.1.1.2. Pěstování hypofyzárních buněčných linií	69
5.2. Strukturně aktivní studie fragmentů peptidu CART	70
5.2.1. Syntéza fragmentů peptidu CART	70
5.2.2. Jodace peptidu CART(61-102)	71
5.2.3. Kompetitivní vazba k nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám	72
5.2.4. Kompetitivní vazba k diferencovaným buňkám PC12	75
5.2.5. Vliv fragmentů peptidu CART na příjem potravy	76
5.2.6. Fosforylace MAPK/ERK1/2, CREB a Akt za pomoci metody Western blot na buněčné linii PC12	77
5.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u myší	78
5.3.1. Vliv na příjem potravy	78
5.3.1.1. Příjem potravy po podání CART peptidu a CCK	78
5.3.1.2. Příjem potravy po podání CART peptidu a antagonistů CCK	79
5.3.2. Synergistický účinek CART peptidu a CCK při aktivaci c-Fos v hypothalamických jádrech	83
5.3.3. Sedativní a analgetické účinky peptidu CART a CCK	86
5.4. Anorektický efekt CCK a peptidu CART v modelu štíhlých a MSG myší	88
5.4.1. Stanovení biochemických parametrů v séru	88
5.4.2. Histologie mozku	89
5.4.3. Účinky peptidu CART(61–102), CCK-8 a NPY na příjem potravy u sytých myších samců C57Bl/6	90
5.5. Charakterizace účinků analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie	94
5.5.1. Detekce receptoru pro PrRP na hypofyzárních buněčných liniích pomocí metody Western blot	94
5.5.2. Optimalizace podmínek vazebných pokusů PrRP k hypofyzárním buněčným liniím	94
5.5.3. Saturační vazebné experimenty	96
5.5.4. Kompetitivní vazebné experimenty	99
5.5.5. Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB za pomoci metody Western blot na buněčné linii RC-4B/C	100

5.5.6. Stanovení uvolňování hypofyzárních hormonů z buněčných liniích	102
6. DISKUZE	103
6.1. Význam nově objevených neuropeptidů	103
6.2. Strukturně-aktivitní studie fragmentů peptidu CART	104
6.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u štíhlých myši	108
6.4. Anorektický účinek peptidu CART a CCK-8 v modelu štíhlých a obézních MSG myši	111
6.5. Charakterizace účinku analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie	113
7. SHRnutí	115
LITERATURA	116
PŘÍLOHA	128

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3V	– Třetí mozková komora (Third Ventricle)
ACB	– nucleus accumbens
ACTH	– Adrenokortikotropní hormon
AgRP	– Agouti related peptide
AM	– Amygdala
ANOVA	– Analýza rozptylu (Analysis of Variance)
ARC	– Nucleus arcuatus
BMI	– Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
BPTI	– Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)
BSA	– Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CART	– Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
CB1	– Kanabinoidní receptory CB1
CB2	– Kanabinoidní receptory CB2
CC	– Corpus callosum
CCK	– Cholecystokinin
CCK ₁	– Receptory cholecystokininu CCK ₁
CCK ₂	– Receptory cholecystokininu CCK ₂
CCX	– Mozková kůra
CNS	– Centrální nervová soustava
CREB	– cAMP Response Element-Binding
CRH	– Kortikoliberin
CRF	– Kortikotropin uvolňující faktor (Faktor uvolňující kortikotropin)
DMN	– Dorsomediální jádro
DMSO	– Dimethylsulfoxid
EGF	– Epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)
ELISA	– Enzymoimunochemické stanovení (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FX	– Klenba
GAL	– Galanin
GHRH	– Hormon uvolňující růstový hormon (somatoliberin) (Growth Hormone Releasing Hormone)
GHS	– Skupina syntetických sekretagogenních peptidů (Growth Hormone Secretagogues)
GHS-R1a	– Receptor pro ghrelin typ 1a
GHS-R1b	– Receptor pro ghrelin typ 1b
GIT	– Gastrointestinální trakt
GLP-1	– Peptid-1 podobný glukagonu (Glucagon Like Peptide-1)
GnRH	– Hormon uvolňující gonadotropin (gonadoliberin) (Gonadotropin Releasing Hormone)
HI	– Hipokampus
ICV	– Podání látek do mozkové komory neboli intracerebroventrikulární podání
IP	– Nitrobřišní podání látek (Intraperitoneal)
JAK	– Janus-kináza (Janus Protein Kinase)
KO	– Obecný termín pro jakýkoliv vyřazený gen (Knock-out)

LH	– Luteinizační hormon (Luteinizing Hormone)
LHA	– Laterální hypotalamus
MALDI-TOF	– Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight
MAPK/ERK1/2	– Mitogen-Activated-Protein Kinases/Extracellular signal-Regulation Kinase 1/2
MCH	– Melanin koncentrující hormon (Melanin Concentrating Hormone)
ME	– Median Eminence
MSG	– Glutamát sodný (Monosodium Glutamate)
α -MSH	– Hormon stimulující α -melanocyty (α -Melanocyte Stimulating Hormone)
NGF	– Nervový růstový faktor (Nerve Growth factor)
NPY	– Neuropeptid Y
NTS	– Nucleus tractus solitarius
Ob-R	– Receptor pro leptin
OC	– Optic chiasm
PACAP	– Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PEI	– Polyethylenimin
PMA	– Phorbol-12-myristate-13-acetate
POMC	– Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)
PRL	– Prolaktin
PrRP	– Peptid uvolňující prolaktin
PVN	– Paraventriculární jádro
PVDF	– Polyvinyliden difluoridová
PYY	– Peptid YY
RIA	– Radioimunochemické stanovení (Radioimmunoassay)
RP-HPLC	– Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SC	– Podkožní (subkutánní) podání látek
SDS	– dodecylsulfát sodný
SE	– Septum
SEM	– Střední chyba průměru (Standard Error of Mean)
STAT	– Signal Transducer and Activator of Transcription
VMN	– Ventromediální jádro
TH	– Talamus
TRH	– Thyrotropin-uvolňující hormon (Thyrotropin Releasing Hormone)
WHO	– Světová zdravotnická organizace (World Health organization)

Dále jsou užívány zkratky podle doporučení IUPAC-IUB. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v L-formě

1. ÚVOD

Pohled na obezitu prochází v dějinách lidstva různým vývojem. Obezita bývala znakem blahobytu a úspěšnosti jedince, na druhé straně se na ni pohlíželo jako na povahovou chybu vyplývající z lenosti či nedostatku vůle. Obezita je poslední dobou často nazývána jako epidemie 3. tisíciletí. V Evropě nyní žije 150 milionů obézních dospělých a 15 milionů obézních dětí. Vize pro rok 2015, vycházející ze současného trendu, počítá na celém světě se 700 miliony obézních dospělých a 2,3 miliardami lidí s nadváhou [3]. Zvyšující se prevalenci obezity lze částečně přičíst vlivům prostředí a částečně genetickým vlivům. K obéznímu stavu dochází hlavně z důvodu dlouhodobé pozitivní energetické bilance jako důsledku nerovnováhy mezi přijatou a vydanou energií. V průběhu evoluce musel člověk přežít období půstu a někdy i velmi dlouhé hladovění. Přežívali tedy jen ti jedinci, kteří se dovedli přizpůsobit: jednak značným omezením energetického metabolismu (v době hladovění), a jednak vytvořením dostatečných energetických zásob (v době hojnosti). Tvorba zásob především ve formě tuku se zakotvila do lidského genomu. Dnešní člověk v prosperujících zemích není ve způsobu svého života tak fyzicky aktivní jako dříve a hlavně má přístup k potravě, která je pro něho nejen potřebou, ale i potěšením, a která je navíc kaloricky bohatá. Jednoduše řečeno jeho energetický příjem neodpovídá energetickému výdeji.

Příjem potravy je regulován pomocí souhry několika systémů. Jedná se zejména o centrální nervový systém (CNS), gastrointestinální trakt (GIT) a tukovou tkáň. Příjem potravy ovlivňuje celá řada látek, hlavně neurotransmitery (nepeptidové jako serotonin, noradrenalin, GABA a endokanabinoidní látky a peptidové o nichž bude podrobně pojednáno dále v této práci) a hormony jako inzulin a cholecystokinin. Během posledních 20 let vědci objevili celou řadu neuropeptidů a peptidových hormonů, které regulují příjem potravy a představují nové možnosti ve vývoji budoucích antiobezitik. Je ale velice těžké nalézt látku bez vedlejších účinků, která by selektivně pouze snížila příjem potravy a tím způsobila snížení tělesné hmotnosti.

1.1. Obezita

Obezita je nadměrné ukládání tělesného tuku v organismu spojené s nárůstem hmotnosti, a to nad 25 % tuku v těle u mužů a nad 30 % tuku v těle u žen. Nejčastějšími

příčinami je narušená rovnováha mezi příjmem a výdejem energie. Nadváha, a především její těžší forma obezita, poškozuje zdraví. Obezita je chronické onemocnění, které již dávno není problémem jen estetickým, ale především problémem zdravotním. Je statisticky prokázáno, že obézní jedinec má podstatně nižší kvalitu i délku života. Obezita se v poslední době stává dokonce druhou nejčastější příčinou úmrtí hned po kouření [4]. Přestože se velmi pokročilo v léčbě obezity, stále zaostává zejména její prevence.

Prevalence obezity u dospělých je 10 až 25 % ve většině zemí západní Evropy a 20-25 % v některých zemích v Americe, v USA je to 25 - 30 %. Prevalence obezity je větší u některých etnik: např. mezi americkými Indiány, Američany hispánského původu a vysokých hodnot dosahují v Mikronésii a Polynésii [5]. V České republice už je 1,5 miliónu obézních lidí, což je 23 % dospělé populace, a rok od roku jich stále přibývá. Dalších 30 %, tedy zhruba 2,7 milionu lidí, má nadváhu. Za posledních pět let počet lidí s obezitou a nadváhou stoupl o 450 tisíc, takové jsou závěry průzkumu agentury STEM/MARK z prosince 2008. Přebytky kilogramy trápí 64 % českých mužů (41 % má nadváhu a 23 % je obézních) a 49 % českých žen (28 % má nadváhu a 21 % je obézních) [6]. Zvláště alarmující je nárůst nadváhy a obezity v dětské populaci [7].

Pro určení stupně nadváhy a obezity se používají různé metody. Nejvyužívanějším způsobem je výpočet indexu tělesné hmotnosti tzv. Body Mass Index (BMI) (Tabulka 1). BMI byl definován v 19. století Belgičanem Queteletem, a proto bývá někdy označován také jako Queteletův index [8]. $BMI = \text{hmotnost v kg} / (\text{výška v m})^2$.

Tabulka 1. *Klasifikace obezity podle WHO [9].*

BMI	Klasifikace	Riziko komplikací obezity
méně než 18,5	podváha	nízké riziko jiných chorob
18,5 - 24,9	normální váha	průměrné
25 - 29,9	nadváha	mírně zvýšené
30 - 34,9	obezita I. stupně	středně zvýšené
35 - 39,9	obezita II. stupně	velmi zvýšené
40 a více	obezita III. stupně	vysoké

Při léčbě nadváhy a obezity je nejúčinnější komplexní přístup: změna stravovacích návyků, zvýšení pohybové aktivity, psychoterapie a farmakoterapie. Farmakoterapie je

indikována pro obézní s BMI větším než 30 a je doporučena většinou až tehdy, nebyla-li úspěšná dosavadní komplexní redukční a pohybová léčba. V minulosti se pro léčbu obezity užívaly běžně deriváty amfetaminu, např. centrálně působící Fentermin, které potlačovaly chuť k jídlu přes noradrenergní a dopaminergní systém, ale měly řadu nežádoucích účinků (psychostimulační účinky a návykovost). V současné době je v České republice schválen pouze jeden lék pro dlouhodobou léčbu obezity a to Orlistat (Xenical – Hoffman-La Roche, Alli – GlaxoSmithKline), který blokuje činnost střevní lipázy a tím snižuje asi o 1/3 vstřebávání tuků v gastrointestinálním traktu. Letos v lednu byl z farmaceutického trhu stažen Sibutramin (Lindaxa – Zentiva, Meridia – Abbott), inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu, který navozuje pocit sytosti. Důvodem bylo zvýšené riziko závažných, nefatálních kardiovaskulárních příhod, jako je cévní mozková příhoda nebo infarkt myokardu. Dalším lékem byl Rimonabant (Acomplia – Sanofi-Aventis), selektivní blokátor kanabinoidních receptorů CB1 [10], který byl ale kvůli závažným vedlejším účinkům (deprese) stažen z trhu v roce 2009.

Pokud nebyla úspěšná ani farmakoterapie, pak je ještě možná bariatrická chirurgie-chirurgická léčba obezity. Tato léčba je určena jenom pro těžkou obezitu III. stupně dle WHO, tzv. morbidní obezitu s BMI nad 40, případně u pacientů s rozvinutými přidruženými nemocemi v důsledku obezity II. st. dle WHO, tj. s BMI nad 35. Nejčastější bariatrickou operací u nás je laparoskopická bandáž žaludku, při níž se kolem horní části žaludku obkrouží silikonový kroužek, který zmenší jeho objem, a tak sníží pocit hladu. Mezi další nejčastěji prováděný chirurgický zákrok patří žaludeční bypass, kdy je zmenšen objem žaludku a tenké střevo je připojeno za vrátníkem [10].

1.1.1. Příčiny vzniku obezity

Příčiny obezity u většiny populace tkví nejčastěji v nadměrném energetickém příjmu a malém energetickém výdeji, který je dán nedostatkem pohybové aktivity anebo na základě poruchy regulace příjmu potravy. Dále se na vzniku obezity významně podílí genetické dispozice (v rozmezí 40-50 %). Jistou úlohu při vzniku obezity sehrávají i hormonální vlivy (snížená funkce štítné žlázy, zvýšená hladina hormonů kůry nadledvin). Emocionální problémy často přispívají ke vzniku a neustálému nárůstu obezity, stejně tak jako některé léky (antidepresiva, psychofarmaka, glukokortikoidy) [11, 12].

1.1.2. Nemoci spojené s obezitou

Nadváha a obezita jsou provázeny významně vyšším rizikem kardiovaskulárních a metabolických onemocnění. Zvyšují riziko vysokého krevního tlaku, vzniku ischemické choroby srdeční, mozkové příhody a anginy pectoris. Jsou rizikovým faktorem u diabetu mellitu II. typu (rezistence k inzulinu) a dyslipidémii. Přispívají i k takovým stavům jako je osteoartróza, protože zatěžují kolena a kyčle, k problémům s dýcháním (spánková apnoe) a vzniku nádorových onemocnění (tlustého střeva, prsu, ledvin, děložního čípku a jiných orgánů). Obézní lidé mají kromě zdravotních problémů i problémy sociální a psychické. Vyskytují se u nich deprese, zakomplexovanost, často mají sníženou sebedůvěru [12].

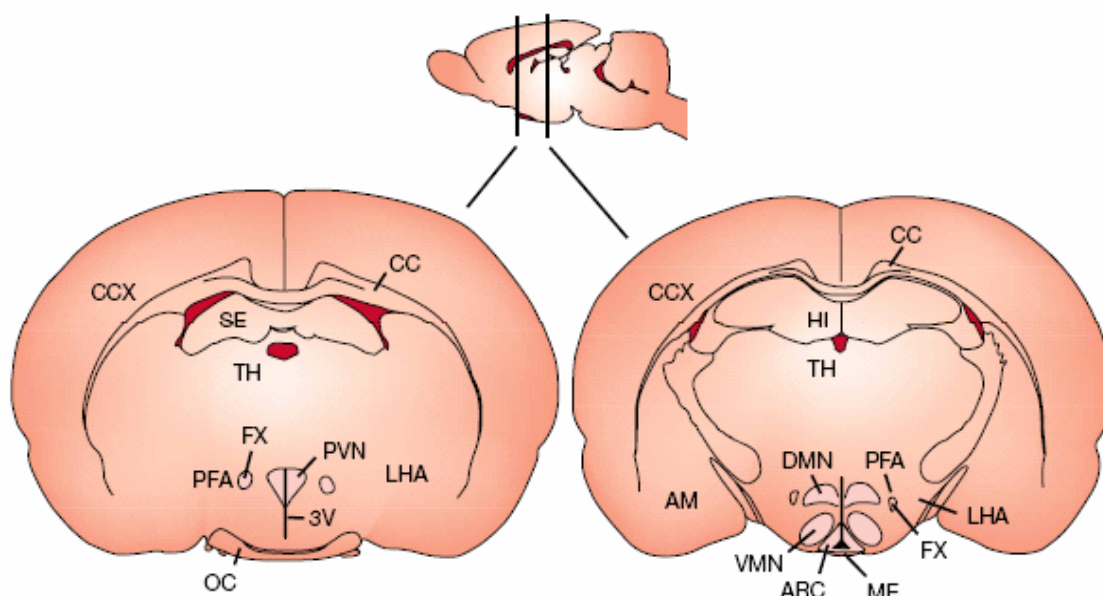
1.2. Regulace příjmu potravy

Příjem potravy je řízen komplexním systémem zahrnujícím jak centrální, tak periferní signály, které se vzájemně ovlivňují. Periferní regulace zahrnuje signály sytosti z GIT, slinivky břišní, nadledvin a z tukové tkáně a ghrelin - jediný signál hladu z GIT. V centrálním nervovém systému se tvoří nepeptidové a peptidové neurotransmitery a endogenní ligandy endokanabinoidních receptorů. Energetická rovnováha je velmi dobře zajištěna krátkodobými a dlouhodobými regulačními mechanismy. Základním centrem regulace je hypothalamus, který obsahuje skupiny neuronů uspořádaných do centra hladu a centra sytosti. Tyto neurony produkují celou řadu orexigenních (látky zvyšující příjem potravy) a anorexigenních (látky snižující příjem potravy) peptidů, kterými se vzájemně ovlivňují hypothalamická centra i ostatní oblasti CNS a koordinuje se komplexní odpověď organismu na příjem potravy [13, 14].

1.2.1. Centrální regulace příjmu potravy

Hypothalamus zajišťuje kontrolu činnosti autonomního nervového systému a endokrinního systému a řídí základní životní funkce: homeostázu - regulaci tělesné teploty, hospodaření s vodou, regulaci srdeční činnosti, aktivitu GIT a emoční projevy [15]. Také je hlavním řídícím centrem regulace příjmu potravy a tělesné hmotnosti. Neurony hypothalamu reagují na periferní regulační peptidy, hladinu krevní glukózy a lipidů a na podněty z aferentních nervů.

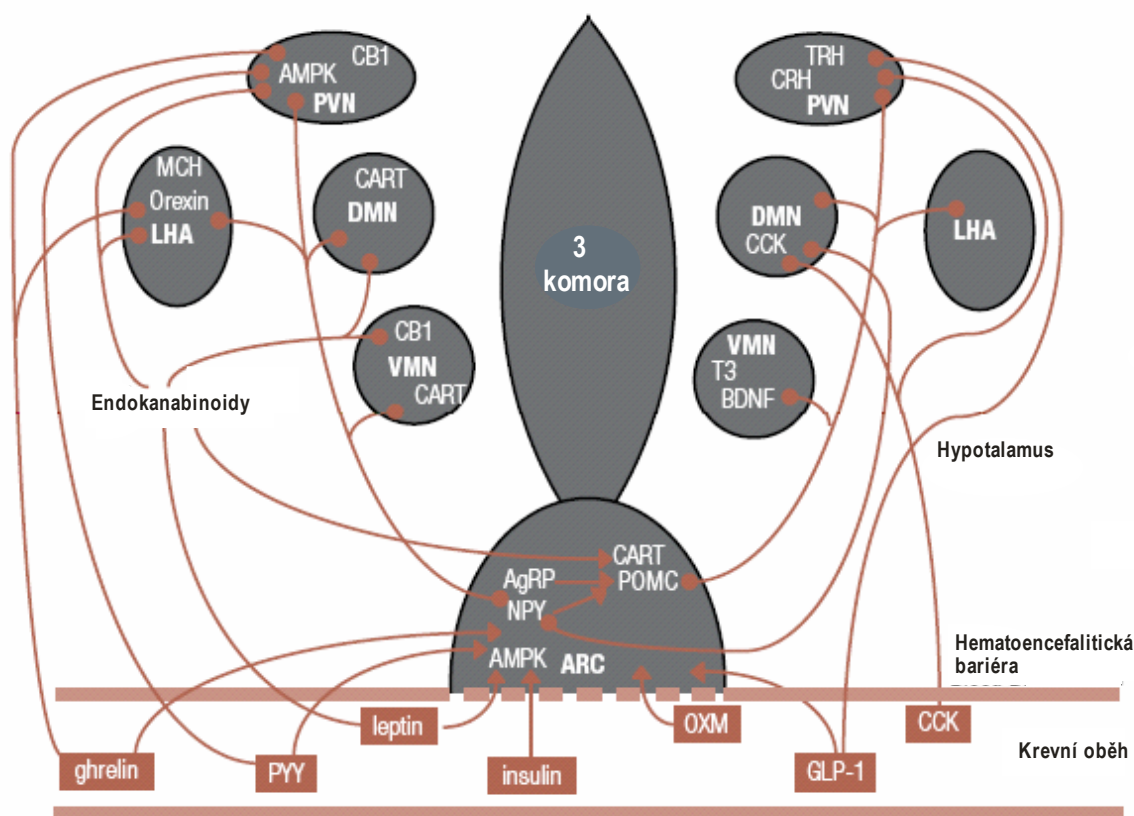
Hypotalamus je rozdělen na několik jader (Obrázek 1), která jsou propojená do komplexní sítě.



Obrázek 1. Řez potkaním mozkem: *Hypotalamus jako hlavní řídicí centrum příjmu potravy a tělesné hmotnosti zahrnuje pro regulaci příjmu potravy tato důležitá jádra: nucleus arcuatus (ARC), paraventrikulární jádro (PVN), ventromediální jádro (VMN), laterální hypotalamus (LHA), dorsomediální jádro (DMN). Vysvětlení dalších zkratk (amygdala (AM), corpus callosum (CC), mozková kůra (CCX), hipokampus (HI), median eminence (ME), optic chiasm (OC), septum (SE), talamus (TH), třetí komora (3V), klenba (FX), (PFA)[13].*

Nucleus arcuatus (ARC) je hlavním hypotalamickým jádrem podílejícím se na řízení příjmu potravy, je umístěn na spodině hypotalamu po obou stranách třetí mozkové komory (Obrázek 1). V ARC se nacházejí receptory pro řadu hormonů přicházejících z periferie a ovlivňujících příjem potravy: leptin, inzulín, ghrelin, kortikoidní hormony (kortizol, kortikosteron), estrogen, růstový hormon a další [16]. Obsahuje dvě hlavní vzájemně propojené populace primárních neuronů: první populace neuronů produkuje neuropeptid Y – (NPY) a agouti-related peptid (AgRP), které zvyšují příjem potravy (jsou orexigenní). Druhá populace neuronů produkuje pro-opiomelanokortin (POMC) a cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), které snižují příjem potravy (jsou

anorexigenní) [17]. POMC je polypeptidový prekursor několika látek: hormonu stimulujícího α -melanocyty (α -MSH, aktivuje MC3 a MC4 melanokortinové receptory a inhibuje příjem potravy; blokováním MC4 receptoru se zvyšuje příjem potravy), adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a β -endorfinů (orexigenní). Oba zmíněné soubory neuronů ARC obsahují mnoho receptorů pro vstupní signály z periferního systému (hlavně leptin, inzulin, a ghrelin). Anorexigenní leptin a inzulin stimulují expresi a sekreci neuronů POMC/CART a také potlačují expresi a sekreci neuronů NPY/AgRP, což vede ke snížení příjmu potravy. Tyto dvě populace neuronů komunikují s ostatními oblastmi hypotalamu jako PVN, DMN a LHA a podílejí se na regulaci chuti k jídlu.



Obrázek 2. Vztah mezi jádry hypotalamu. Cirkulující hormony a neuropeptidy působí přímo na ARC, kde ovlivňují příjem potravy. V ARC jsou dvě populace neuronů: orexigenní neurony NPY/AgRP a anorexigenní neurony POMC/CART. Význam zkratk je vysvětlen u obrázku 1 a v textu [19].

Poškozením ARC (třeba chemicky – glutamátem sodným) dochází k rozvoji obezity. Neurony NPY/AgRP z ARC komunikují s neurony paraventriculárního jádra, které produkují thyrotropin-uvolňující hormon (TRH) a kortikoliberin (CRH), který se také účastní regulace energetické bilance příjmu potravy a výdeje energie. Centrální podání těchto látek snižuje příjem potravy a tělesnou hmotnost [18].

Ventromediální jádro jako „centrum sytosti“ je další důležitou oblastí podílející se na příjmu potravy, je charakterizováno vysokou hustotou receptorů pro centrální i periferní signály. Obsahuje velkou populaci neuronů citlivých vůči glukose a dostává přímé signály z ARC (NPY/AgRP a POMC neuronů). Poškozením VMN dojde k hyperfágii (přejídání) a tak k rozvoji obezity [13].

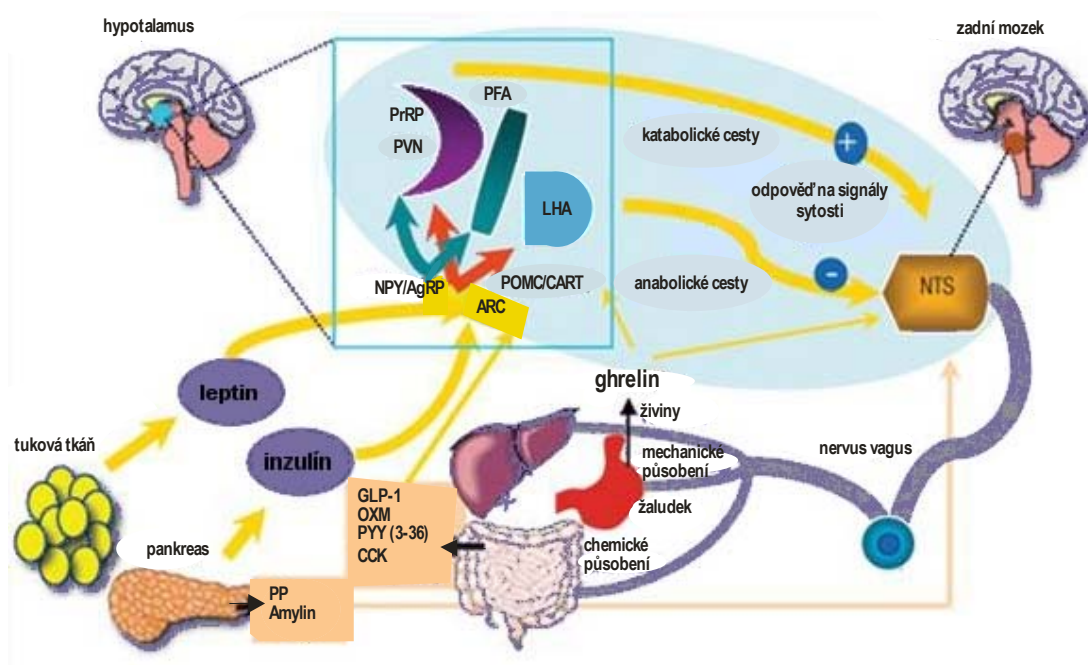
Laterální hypotalamus byl nazván „centrum hladu“, produkuje orexigenní neuropeptidy: melanin-koncentrující hormon (MCH) a orexiny. Melanin-koncentrující hormon je cyklický malý neuropeptid, jehož exprese je zvýšena hladověním a snížena po podání leptinu. Neurony v laterálních, dorsomediálních a perifornikálních oblastech hypotalamu produkují dva orexigenní peptidy: orexin A (hypokretin 1) a orexin B (hypokretin 2), které vznikají ze stejného prekursoru pre-proorexinu. Neurony produkující orexiny reagují přímo na nízkou hladinu glukózy. Orexiny stimulují chuť k jídlu také aktivací opioidních receptorů a účastní se regulace nespavosti. Další orexigenní peptid galanin je produkován zejména v PVN a LHA [20]. Poškození LHA vyvolá hypofágii (snížení příjmu potravy) a tím snížení tělesné hmotnosti [13, 20]. Naopak destrukce dorsomediálního jádra vyvolá hyperfágii a obezitu; přitom DMN obsahuje velké množství nervových zakončení z neuronů produkujících jak NPY tak α -MSH [21] (Obrázek 2).

Příjem potravy významně, ale neselektivně ovlivňují nepeptidové neurotransmitery, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1. o lécích proti obezitě stažených z trhu. Serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) je už dlouhou dobu spojován s příjmem potravy a snižováním hmotnosti. Farmakologické látky, které zvyšují aktivitu 5-HT v CNS, inhibují příjem potravy a podporují hubnutí. Naopak chemické zničení serotonergních neuronů nebo zablokování syntézy serotoninu způsobuje hyperfágii [20]. V regulaci příjmu potravy se dále uplatňují dopamin, katecholaminy, histamin a endokanabinoidní systém.

1.2.2. Periferní regulace příjmu potravy

Mezi nejdůležitější periferní orgány regulující krátkodobý příjem potravy patří GIT,

slinivka břišní a nadledviny. Z GIT pocházejí: glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1), oxyntomodulin, (OXM), peptid YY (PYY) a cholecystokinin (CCK), kde se uvolňují během jídla či v jeho očekávání. Jediným orexigenním hormonem pocházejícím z GIT je ghrelin. Tyto látky mají velký význam především při krátkodobé regulaci energetické rovnováhy. Přesný způsob, jakým každý z těchto peptidů signalizuje do CNS, se může u jednotlivých látek lišit: mohou buď působit přímo na neurony v CNS po projití nebo obejití hematoencefalitické bariéry, většina z nich ale působí přes nervus vagus a aferentní vlákna do oblasti nucleus tractus solitarius (NTS), která je propojena s nervovými drahami hypotalamických jader ARC, PVN, kde jsou tyto signály sytosti integrovány se signály leptinu a inzulínu z tukové tkáně [13, 15].



Obrázek 3. Centrální a periferní regulace příjmu potravy. *Leptin a inzulín pronikají do mozku přes hematoencefalitickou bariéru do ARC, kde stimulují expresi a sekreci anorexigenních POMC/CART neuronů a potlačují expresi a sekreci orexigenních AgRP/NPY neuronů, což způsobuje snížení příjmu potravy. Orexigenní účinek ghrelinu je zprostředkován AgRP/NPY neurony. Leptin, inzulín a ghrelin ovlivňují dlouhodobou regulaci příjmu potravy. Krátkodobě působící hormony např. CCK a GLP-1 vznikají v GIT a jejich signál je do mozku přenášen přes nervus vagus do mozkového kmene (NTS), kde jsou pak tyto signály spojeny nervovými drahami s hypotalamickými jádry (ARC, PVN a LHA) a dochází k regulaci příjmu potravy a výdeje energie [22].*

Mezi hormony slinivky břišní patří inzulín a amylin, které jsou vylučovány β -buňkami, glukagon je produkován A-buňkami a je funkčním antagonistou inzulinu. Dalším hormonem je pankreatický polypeptid produkováný PP buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Tyto hormony ovlivňují metabolismus glukosy, čímž ovlivňují také příjem potravy a celkový energetický metabolismus [23].

Dlouhodobá regulace příjmu potravy je zajištěna především adipokiny z tukové tkáně (Obrázek 3). Sérové hladiny anorektického adipokinu leptinu významně korelují s množstvím tukové tkáně v organismu. Absence leptinu je vzácná monogenní porucha vedoucí k morbidní obezitě již v časném dětském věku [13, 14, 22].

1.3. Dlouhodobé a krátkodobé působení peptidů ovlivňujících příjem potravy

Peptidové hormony, které regulují příjem potravy, mohou být rozděleny na krátkodobě působící jako jsou CCK, glukagon, GLP-1 a dlouhodobě působící, které jsou ukazateli energetických zásob, jako je leptin a inzulín (Tabulka 2).

Tabulka 2. Přehled peptidů ovlivňující příjem potravy.

Peptid	Místo vylučování	Doba účinku	Chuť k jídlu
Leptin	Tuková tkáň, hypotalamus/mozkový kmen	dlouhodobý	anorexigenní
Inzulín	Pankreas	dlouhodobý	anorexigenní
CCK	GIT	krátkodobý	anorexigenní
PYY	GIT	krátkodobý	anorexigenní
GLP-1	GIT	krátkodobý	anorexigenní
Ghrelin	Periferie, hypotalamus	Dlouhodobý, krátkodobý	orexigenní
CART	Hypotalamus	krátkodobý	anorexigenní
α MSH	Hypotalamus	krátkodobý	anorexigenní
NPY	Hypotalamus	dlouhodobý	orexigenní
AgRP	Hypotalamus	dlouhodobý	orexigenní
MCH	Hypotalamus	krátkodobý	orexigenní
Galanin	Hypotalamus	krátkodobý	orexigenní
Orexin A/ Orexin B	Hypotalamus a GIT	krátkodobý	orexigenní

1.3.1. Peptidy dlouhodobě působící

Mezi dlouhodobě působící peptidy řadíme periferní leptin, inzulin, ghrelin a centrální NPY a AgRP (viz Tabulka 2). Leptin a inzulin jsou anorexigenní peptidy. Leptin signalizuje do mozku z tukové tkáně nadměrné nahromadění zásob energie a tím dává signál ke snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje. Ghrelin je jediným orexigenním periferním peptidem s nejvyšší hladinou v krvi právě tehdy, když je žaludek prázdný (před příjmem potravy). Pokles plazmatické hladiny ghrelu je možné pozorovat krátce po příjmu potravy, tedy po zaplnění žaludku. Ghrelin tak ve své podstatě představuje jakýsi signalizátor pocitu hladu [13].

1.3.1.1. Leptin

Název leptinu pochází z řeckého slova „leptos“ - tenký, štíhlý. Je to cytokin produkovaný buňkami bílé tukové tkáně – adipocyty, ale v menší míře i placentou a žaludkem [24]. Jeho objev byl publikován v roce 1994 [25], ale již dříve byla popsána genová mutace leptinového genu (*ob* gen) u myši, která vede k rozvoji morbidní obezity a diabetu. *Ob/ob* myši nejsou schopny produkovat leptin, mají rezistenci k inzulinu a jsou neplodné [26]. Chronické podávání leptinu *ob/ob* myším vede ke snížení příjmu potravy a k úbytku jejich tělesné hmotnosti. U pacientů s obezitou paradoxně nacházíme vysoké koncentrace leptinu, podání leptinu obézním ale nevede ke snížení hmotnosti. Tento stav se nazývá „leptinová rezistence“: buď signalizace leptinu do buňky není plně funkční, nebo je nedostatečný transport leptinu přes hematoencefalitickou bariéru [26].

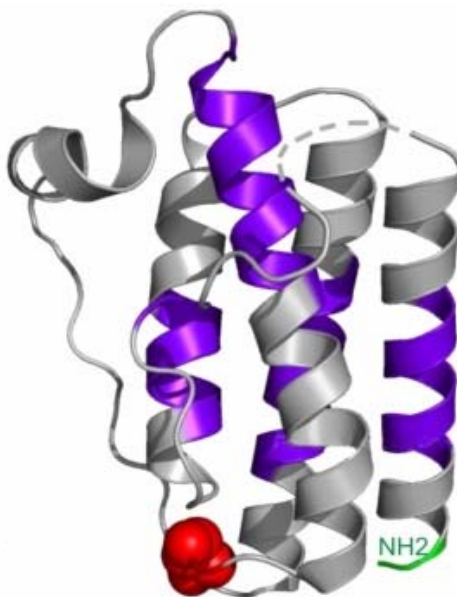
Dalším obezitním fenotypem jsou *db/db* myši, které mají na rozdíl od *ob/ob* myši hladiny leptinu zvýšené. *Db/db* myši mají nefunkční receptor pro leptin a tudíž podávání leptinu těmto myším neovlivní jejich fenotyp [27]. *Fa/fa* potkani, kteří jsou považováni za model pro prediabetes, mají mutaci leptinového receptoru, jež způsobuje hyperfágií, inzulinovou rezistenci, hyperinzulinémií, hyperlipoproteinémií a obezitu [27].

Leptin reguluje energetickou bilanci pomocí negativní zpětné vazby. Leptin z tukové tkáně proniká přes hematoencefalitickou bariéru do CNS, do ARC v hypothalamu, kde potlačuje expresi a sekreci orexigenních NPY/AgRP neuronů a stimuluje expresi a sekreci anorexigenních CART/POMC neuronů; to má za následek snižování příjmu potravy [26, 28].

Leptin plní v organismu početné funkce, jeho hlavním úkolem je adaptace organismu na hladovění. Podílí se na udržování energetické homeostázy, signalizuje množství tuku v organismu, snižuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej, přímo inhibuje koncentraci intracelulárních lipidů, zvyšuje vychytávání glukosy. Náhlé změny jeho hladin jsou spojeny s nástupem puberty a poruchami příjmu potravy (anorexie, bulimie) [26]. Struktura leptinu je uvedena na Obrázku 4 [29].

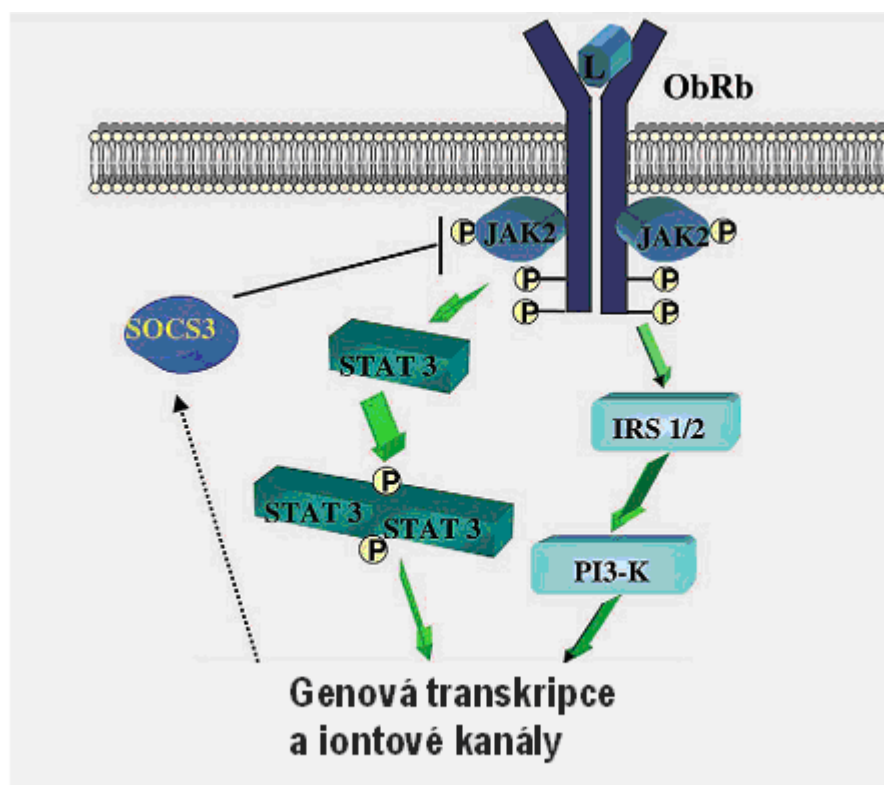
Receptory pro leptin (Ob-R) byly identifikovány v roce 1995 skupinou Tartaglii a kol. [30]. Patří do I. třídy cytokinových receptorů. Všechny popsané izoformy receptoru pro leptin mají stejnou extracelulární část, ale rozdílnou intracelulární část. Existují tyto dvě dlouhé izoformy leptinu: nesignalizující OB-R_L a signalizující OB-R_b, která je hustě zastoupena v hypothalamu (v ARC, VMN, PVN a DMN) [26, 30]. Krátké nesignalizující izoformy Ob-R_a, Ob-R_c, Ob-R_d (izoformy s různou délkou intracelulární domény) se podílejí na aktivním transportu leptinu z periferie přes hematoencefalitickou bariéru do CNS.

Dále byla prokázána existence tzv. cirkulujícího neboli solubilního leptinového receptoru Ob-R_e, tvořeného pouze extracelulární doménou, která slouží jako vazebný protein pro transport leptinu v krvi.



Obrázek 4. Struktura leptinu [29]. Molekula leptinu o 167 aminokyselinách tvořená čtyřmi antiparalelními α -helixy.

Leptin využívá k přenosu signálu do buňky pouze Ob-R_b izoformu, která obsahuje intracelulární strukturu nutnou pro aktivaci JAK-kinázy (Janus Protein kinase) a proteiny STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), které po fosforylaci tyrosinů dimerizují a jsou následně translokovány do jádra, kde stimulují transkripci genů (Obrázek 5). Fosforylace STAT3 je inhibována supresorem signalizace cytokinu (SOCS), konkrétně SOCS3, čímž je zprostředkována negativní zpětná vazba JAK/STAT dráhy, jak je vidět na obrázku 5. Dalším modelem myši leptinové rezistence jsou SOCS3 KO myši - mají vyřazený gen pro SOCS3, což vede k účinnější leptinem indukované fosforylaci STAT3 v hypothalamu, což má za následek potlačení příjmu potravy a z toho plyne větší úbytek hmotnosti [13, 31].



Obrázek 5. Signalizace leptinu. Na Ob-R_b receptor se naváže leptin (L), který aktivuje JAK2 kinázu; ta buď aktivuje STAT3 a nebo substrát inzulinového receptoru (IRS) ten pak fosfatidyl-3 kinázu (PI3-K). V obojím případě dochází ke genové transkripci. Negativní zpětnou vazbu zprostředkovávají SOCS3 (supresor cytokinové signalizace) [32].

1.3.1.2. Inzulín

Inzulín je hormon produkovaný B buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Byl izolován v roce 1921 Frederickem Bantingem a Charlesem Bestem [33]. Je to protein, který se skládá ze dvou polypeptidických řetězců (A a B), které jsou spojeny třemi disulfidickými můstky. Inzulín je hormon se širokým spektrem účinků. Přímo i nepřímo ovlivňuje všechny orgány a tkáně v těle. Hlavní funkcí inzulínu je stimulovat anabolické děje pro cukry, proteiny a tuky, přičemž konečný důsledek všech reakcí je snižování hladiny glukosy v těle. Inzulín stimuluje nejen tvorbu glykogenu, ale i triacylglycerolů.

Inzulínový receptor je membránový glykoprotein, patřící do skupiny tyrosinkinasových receptorů tvořený dvěma α - a dvěma β - podjednotkami vzájemně spojenými dvěma disulfidickými můstky [34]. Je lokalizován ve všech tkáních obratlovců.

Plazmatické hladiny inzulínu korelují přímo s tělesnou hmotností a zejména s tělesným tukem [35]. Obézní lidé mají vyšší bazální hladiny inzulínu a vylučují ho více v reakci na jídlo, než lidé s normální hmotností („inzulínová rezistence“) [36]. V CNS se inzulínové receptory nacházejí v ARC [34]. Po podání exogenního inzulínu do mozku se snižuje příjem potravy a zvyšuje výdej energie, a také se zesilují anorektické účinky periferně podávaného CCK [36].

1.3.1.3. Ghrelin

Ghrelin byl objeven v roce 1999 Kojimou a jeho spolupracovníky jako přirozený ligand sirotčího receptoru, který je specifický pro skupinu GHS peptidů (growth-hormone secretagogues) [37]. Ghrelin se vylučuje především v žaludku, dále také v tenkém a tlustém střevě. V menší míře se vyskytuje v pankreatu, ledvinách, hypotalamu (ARC), hypofýze, srdci a placentě [38].

Ghrelin má v organismu řadu fyziologických funkcí: zvyšuje příjem potravy, stimuluje uvolnění růstového hormonu, zvyšuje motilitu žaludku a žaludeční sekreci, dále ovlivňuje funkci slinivky břišní a metabolismus glukosy, má vliv na metabolismus kostí a má kardioprotektivní účinky [38]. Ghrelin je jedinou periferní orexigenní látkou. Plazmatické hodnoty ghreluinu se zvyšují před jídlem a během hladovění a klesají na nejnižší hodnotu během jedné hodiny po jídle [38].

Ghrelin působí centrálně buď přímým kontaktem s neurony v hypotalamu, nebo

nepřímo přes nervus vagus. ARC je hlavním místem účinku pro ghrelin i leptin. Ghrelin v ARC aktivuje orexigenní neurony NPY/AgRP a potlačuje expresi a sekreci anorexigenních neuronů POMC/CART. Účinek leptinu je opačný, potlačuje sekreci orexigenních peptidů [38]. Leptin je tedy funkčním endogenním antagonistou ghreluinu, potlačuje ghrelinem navozený příjem potravy.

Preproghrelin je tvořen 117 aminokyselinami, z nichž 23 N-terminálních aminokyselin představuje signální peptid. Po odštěpení signální sekvence a odštěpení prosekvence vzniká ghrelin obsahující 28 aminokyselin, který je posttranslačně modifikován, je esterifikován na hydroxylové skupině serinového zbytku v pozici 3 n-oktanovou kyselinou. Tato hydrofobní skupina je nezbytná pro biologickou aktivitu ghreluinu a jeho vazbu na ghrelinový receptor GHS-R [37].

Ghrelinový receptor se exprimuje kromě ARC i ve VMN. Analýza nukleotidové sekvence genu GHS-R odhalila dva typy receptorů, pojmenované jako GHS-R1a a GHS-R1b, oba spřažené s G-proteinem [38].

1.3.2. Peptidy krátkodobě působící

Mezi krátkodobé peptidy řadíme ty, které působí rychle a intenzivně před, či hned po příjmu potravy. Mezi krátkodobě působící anorexigenní řadíme centrální peptidy: CART, α -MSH a periferní, PYY, CCK a GLP-1. GLP-1 se uvolňuje ihned po příjmu potravy a také po neurohormonální stimulaci a jeho hladina klesá s poklesem příjmu potravy. Krátkodobě působící orexigenní centrální peptidy jsou: NPY, MCH, galanin a orexiny.

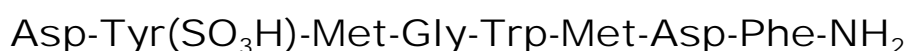
1.3.2.1. Cholecystokinin (CCK)

V roce 1928 vědci Ivy a Oldberg objevili hormon, který působí kontrakce žlučníku - cholecystokinin (CCK) [39, 40]. V roce 1973 Gibbs a jeho spolupracovníci poprvé označili CCK za první střevní hormon, který ovlivňuje sytost a snižuje příjem potravy [41]. CCK je jeden z peptidů, které hrají důležitou roli v regulaci krátkodobého příjmu potravy. Je to neuropeptid, který se nachází v mozku a GIT, má tedy funkci centrální i periferní. V periférii je CCK vylučován ze sliznice duodena a jejunu, kde jsou přítomny endokrinní I buňky produkující CCK. CCK stimuluje kontrakci žlučníku, sekreci amylázy ze slinivky

břišní a inhibuje vyprazdňování žaludku [42, 43].

CCK v mozku plní funkci neurotransmiteru. Nejvyšší koncentrace CCK byly prokázány v mozkové kůře, amygdale a hipokampu [42, 43]. Značné množství CCK se také nachází v hypotalamu a dorsálním zadním mozku. Jeho působení v CNS má za následek sedativní a anxiogenní účinek; ovlivňuje spánek (sedace), bolest (analgeze) a zlepšuje paměť [44].

Cholecystokinin má několik molekulárních forem s různými počty aminokyselin: CCK-4, CCK-8, CCK-22, CCK-33, CCK-39 a CCK-54 [44]. V periférii se nejvíce vyskytuje CCK-8 (Obrázek 7) a CCK-33. V CNS jsou přítomny CCK-8 a CCK-4. Signál CCK-8 z periferie je přenášen do mozku prostřednictvím nervu vagu do mozkového kmene. Tento efekt je zprostředkován přes CCK₁ receptory na nervu vagu [45]. CCK působí prostřednictvím dvou receptorů - dříve známé jako CCK_A a CCK_B, dnes často označované jako CCK₁ a CCK₂ receptory, oba jsou spřažené s G-proteinem. Receptor CCK₁ se zdá být mnohem důležitější v regulaci chuti k jídlu [46]. Nenachází se jen v periférii v GIT, ale i v NTS a dorsomediálním hypotalamu [42]. CCK₂ se vyskytuje v celém mozku, jeho největší koncentrace je v mozkové kůře. Matson a kol. dokázali, že centrální podání CCK s leptinem je mnohem účinnější ve snižování hmotnosti než leptin samotný [47], neboť CCK s leptinem působí synergisticky [48].



Obrázek 7. Primární struktura C-koncového oktapeptidu cholecystokininu CCK-8.
[46].

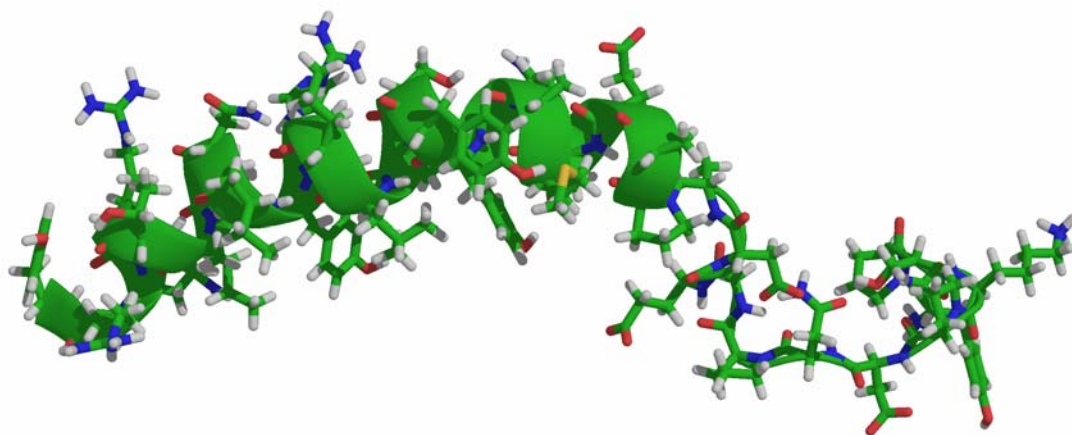
1.3.2.2. Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) byl objeven v CNS v roce 1982 Tatemotem a kol. [49]. Jeho jméno je odvozeno z tyrosinů na N- a C- konci. NPY patří strukturou do skupiny pankreatických polypeptidů a je jedním z význačných hypotalamických orexigenních peptidů [49]. Je složen z 36 aminokyselin a působí jako neurotransmiter [49] (Obrázek 6). NPY je jedním z nejmohutnějších stimulátorů příjmu potravy. Kromě toho způsobuje vazokonstrikci, ovlivňuje motilitu GIT, reguluje reprodukční a endokrinní systém a působí

jako modulátor paměti [50]. V periférii se NPY nachází v sympatických neuronech a v nadledvinových chromafinových buňkách. V CNS se vyskytuje v mozkové kůře, mozkovém kmeni, hypotalamu, amygdale, hipokampu a talamu.

NPY je ovlivňován leptinem a inzulínem; pokud jejich hladiny jsou zvýšeny, syntéza NPY je potlačena a příjem potravy je snížen. CCK a peptidy CART ovlivňují negativně účinek NPY. Kombinace CCK a NPY způsobila snížený příjem potravy oproti samotnému NPY u potkanů [51]. Peptidy CART potlačují příjem potravy zvýšený účinkem NPY [52]. Centrálně podávaný NPY zvýšil příjem potravy u geneticky obézních (*ob/ob*) a geneticky diabetických (*db/db*) myši [53].

Receptory pro NPY patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Mají řadu fyziologických funkcí, podílejí se na regulaci krevního tlaku, ovlivňují příjem potravy a zlepšují paměť. Účinek NPY je zprostředkován šesti typy receptorů: nazvanými Y_{1-6} . S regulací příjmu potravy souvisí dva typy receptorů Y_1 a Y_5 . Oba dva receptory se nacházejí v CNS. Selektivní antagonisté NPY s vazbou zejména na receptory Y_5 inhibují příjem potravy a působí snížení tělesné hmotnosti u obézních potkanů [54].



Obrázek 6. Struktura NPY [49]

1.4. Peptidy CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)

1.4.1. Objev a výskyt

V roce 1981 Spiess a jeho spolupracovníci izolovali peptid s nejasnou funkcí z ovčího hypotalamu [55]. V roce 1995 Douglas a kol. [56] zjistili, že po podání kokainu a amfetaminu dochází ke zvýšené expresi mRNA pro tento peptid v nucleu accumbens, odtud také pochází název peptidu CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) [56]. Strukturu peptidu CART a jeho hlavní funkci popsali prvně Kristensen a kol. a Thim a kol. [2, 52].

Peptidy CART se vyskytují v centrální nervové soustavě a také v periférii. V CNS se vyskytují ve všech částech mozku, ale v různé koncentraci; nejvyšší koncentrace CART mRNA je v hypothalamických jádrech: ARC, PVN, DMN a v LHA a také v hypofýze [57]. CART peptidy se vyskytují v periférii v dřeni nadledvin, Langerhansových ostrůvcích, pankreatu a v trávicím traktu [58-60].

1.4.2. Struktura

Lidský gen pro CART je lokalizován na chromosomu 5, má 2,5 kb a obsahuje tři exony a dva introny [61]. Gen peptidu CART je evolučně konzervovaný, což ukazuje na podobnou funkci u různých živočišných druhů, a tedy i velkou důležitost [61]. Transkripce genu vznikají dvě jinak štěpené mRNA, z nichž po odštěpení pre-peptidu vznikají dva různě dlouhé propeptidy CART buď o 102 (myši a potkaní) nebo 89 aminokyselinách (lidský, myši a potkaní) [56]. Aminokyselinová sekvence dlouhé a krátké potkaní formy je na obr. 8A. Krátká forma propeptidu CART (myši a potkaní) je rozdílná od lidské v pozici 42, kde v lidském peptidu je izoleucin vyměněn za valin, přičemž C-koncová sekvence je vždycky stejná [56]. Prohormon-konvertáza 2 (PC2) štěpí dlouhý i krátký propeptid na dvě přirozeně biologicky aktivní formy, CART(55-102/42-89) a CART(62-102/49-89) [62]. Jejich struktura je znázorněna na Obrázku 8A. Pomocí MS a NMR spektroskopie bylo prokázáno, že peptid CART(61-102) obsahuje šest cysteinů, jež tvoří tři disulfidické můstky a to mezi cysteiny v pozici 68 a 86, 74a 94, 88 a 101 [2, 63], což je vidět z Obrázku 8B.

A)

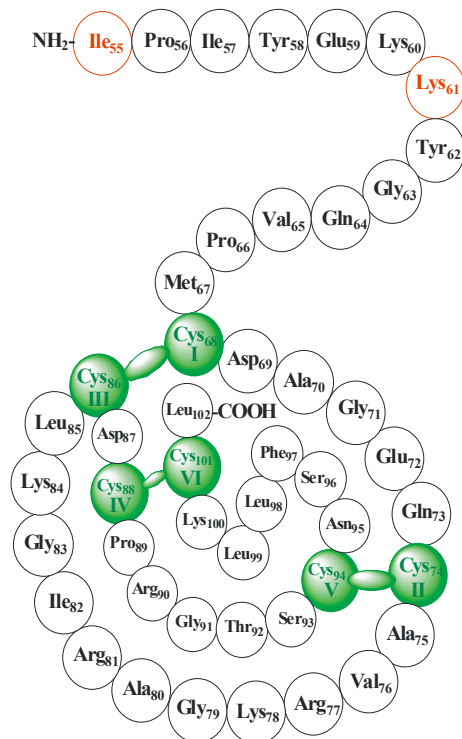
Potkaní dlouhá forma

QEDAE LQPRALDIYSAVDDASHEKEL **ELPRRLRAPGAVLQ** IEALQEV LKKLKS **KRIPIYEKKYGVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL** 102

Potkaní krátká forma

QEDAE LQPRALDIYSAVDDASHEKEL **LI** IEALQEV LKKLKS **KRIPIYEKKYGVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL** 89

B)



Obrázek 8. Struktura peptidu CART. A) Aminokyselinová sekvence dlouhé a krátké formy peptidu CART [1]. Biologicky aktivní peptidy CART(55-102) a (62-102), vyštěpené z dlouhého propeptidu CART, jsou totožné s peptidy (42-89) a (49-89), vyštěpenými z krátkého propeptidu. Místa štěpení pro prohormon-konvertázu jsou znázorněna tučně. B) Struktura peptidu CART(55-102) [2]. Červeně zvýrazněné aminokyseliny označují počátek dvou biologicky aktivních forem (55-102) a (61-102).

1.4.3. Fyziologická úloha peptidu CART

Peptidy CART jsou zařazovány mezi peptidové neurotransmitery [1]. V mozku se nacházejí pouze v neuronech (např. ARC) společně s dalšími neurotransmitery jako je γ -aminomáselná kyselina, dopamin a glutamát [2]. Z nich se uvolňují při zvýšené intramolekulární koncentraci vápenatých iontů [64]. Peptidy CART se vyskytují i v periferii, a to hlavně v GIT, patří tedy mezi tzv. „brain-gut“ peptidy, které jsou často i neuropeptidy. Působí v celé řadě fyziologických procesů, ovlivňují příjem potravy (anorexigenní účinek), pocit sytosti, stres, neuroendokrinní regulace, srdeční funkce, bolest a střevní hybnost (motilitu) a ovlivňují funkci pankreatu [1, 64, 65]. Peptidy CART ovlivňují neuroendokrinní systémy, jako hypotalamo-hypofýzo-adrenální osu (HPA), hypotalamo-hypofýzo-tyroidální osu (HPT) a sympato-adrenální systém (SAM) [57, 58, 66].

Peptidy CART jsou přítomny v každé ze tří složek HPA osy a v portální krvi [67]. Centrální podání peptidů CART aktivuje neurony CRH a stimuluje sekreci ACTH a tím i kortikosteronu, tuto sekreci lze blokovat antagonistou CRH astresinem [28]. Adrenalektomie (odnětí nadledvin) snižuje expresi CART mRNA jak v PVN, tak v ARC, následné podání kortikosteronu pak částečně vrací hladiny peptidu CART do stavu před adrenalektomií [68]. Exprese a uvolnění peptidu CART do hypofýzy je regulováno CRH a glukokortikoidy [69].

Peptidy CART z hypotalamických neuronů uvolňované do PVN podporují sekreci TRH, jenž zvyšuje termogenezi v hnědém tuku a svalu. Centrálně podaný peptid CART pak zvyšuje expresi uncoupling proteinu (UCP) [70].

Myši s vyřazeným genem pro CART mají normální hmotnost při standardní stravě, ale obezita u nich může být navozena vysokokalorickou stravou [65, 71].

1.4.3.1. Vliv peptidu CART a dalších látek na příjem potravy a jejich vzájemný vztah

Zanedlouho po objevu peptidů CART byla studována jejich spojitost s regulací příjmu potravy, a to na základě distribuce peptidů CART v mozku, zvláště v hypotalamu (v ARC, LHA, PVN a nucleus accumbens - ACB) a jejich přítomnosti v GIT [69, 72].

Důkaz anorexigenních vlastností peptidů CART provedli Kristensen a kol. [52], kteří ukázali, že exprese mRNA CART v ARC je regulována leptinem, že CART mRNA je

snížena v ARC u hladových zvířat a téměř nesnížena u hladových *ob/ob* myši s nefunkční signalizací leptinu. V nucleu arcuatu jsou peptidy CART společně lokalizovány s α -MSH [52, 73], inhibitorem příjmu potravy. V neuronech nucleu arcuatu, které produkují peptidy CART, byly nalezeny receptory pro leptin, což naznačuje, že peptidy CART mohou zprostředkovávat v hypotalamu účinek leptinu [73].

Podání peptidu CART(61-102) do nucleus accumbens mělo za následek inhibici příjmu potravy u myši [2, 74, 75]. Tato oblast se považuje za jedno z možných míst působení anorexigenní aktivity peptidů CART, které tu jsou hojně zastoupeny.

Kromě toho, ICV a intracisternální podání (podání do prostoru mezi mozečkem a prodlouženou míchou, který je vyplněn mozkomíšním mokem) peptidu CART(55-102) inhibovalo sekreci žaludečních šťáv a vyprazdňování žaludku [76]. Kristensen a kol. zjistili také interakci mezi peptidy CART a NPY, kdy peptid CART tlumil orexigenní aktivitu NPY [52]. Peptidy CART byly rovněž prokázány v GIT [1] a v nervu vazu [77, 78]. Nezdá se však, že by periferní peptidy CART intenzivně ovlivňovaly příjem potravy. IP injekce relativně vysokých dávek peptidu CART(55-102) nesnížila příjem potravy [70, 79].

Dále peptidy CART regulují mezokortikolimbický dopaminergní systém a mohou tak ovlivňovat reakci a odpověď na působení psychostimulantů. Existují důkazy o interakci mezi peptidy CART a endokanabinoidním systémem [80]. Endokanabinoidy mají orexigenní účinky a inhibují anorexigenní aktivitu peptidů, mezi nimi i peptidu CART. Endokanabinoid anandamid zvyšuje příjem potravy aktivací receptoru CB1, zatímco antagonist receptoru CB1 inhibuje příjem potravy, to naznačuje, že peptidy CART se podílejí na orexigenním účinku anandamidu [81].

Mezi dalšími důležitými hormony, jejichž účinky by mohly souviset s účinky peptidů CART, je CCK. Bylo zjištěno, že velká část neuronů peptidů CART v nervu vazu obsahuje také receptor CCK₁ [77]. CCK reguluje expresi peptidu CART ve vágových aferentních neuronech prostřednictvím aktivace protein kinázy C (PKC) a CREB [78].

Přesná role peptidu CART v regulaci příjmu potravy není úplně objasněna. Peptidy CART působí jako anorexigenní látky, ale zatím zcela není objasněn mechanismus jejich působení. Navíc dosud není znám jeho receptor [1]. Peptidy CART mohou být prospěšné k pochopení metabolických mechanismů vedoucích k obezitě a následně k využití pro její terapii.

1.4.3.2. Další účinky peptidu CART

Peptidy CART mohou být také produkovány buňkami Langerhansových ostrůvků, ale i parasympatickými nervovými vlákny, která inervují tuto tkáň. Peptidy CART inhibují sekreci inzulínu stimulovanou účinkem glukosy [59].

Peptidy CART stimulují sekreci ACTH, CRH i sekreci kortizolu a zároveň CRH a glukokortikoidy zvyšují transkripční aktivitu genu pro CART [68]. Adrenalektomie snižuje koncentraci mRNA pro CART a peptidů CART jak v ARC a v PVN, tak i v krvi. Podáním kortikosteronu se pak částečně vrací hladiny CART do stavu před adrenalektomií [68]. Peptid CART rovněž stimuluje expresi TRH v PVN [57].

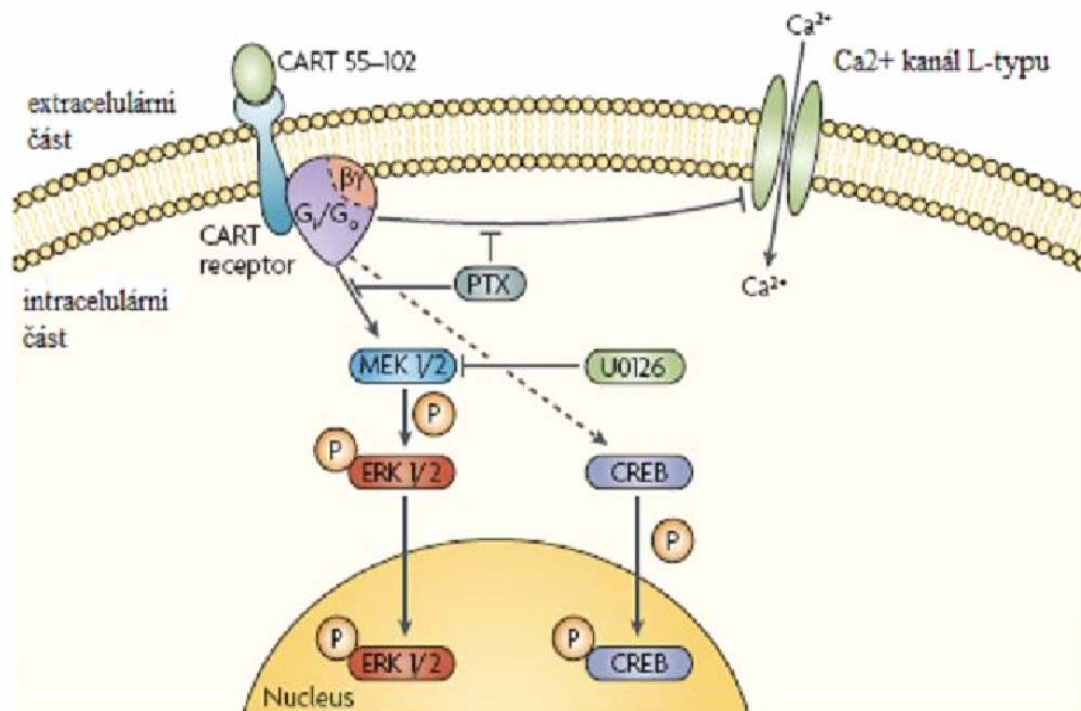
1.4.4. Receptor pro peptidy CART a buněčná signalizace

I když byl peptid CART objeven před více jak 15 lety, zatím se nepodařilo identifikovat jeho receptor. Byly však publikovány studie, které dokazovaly, že receptory pro peptidy CART existují. Například bylo zjištěno, že po centrálním podání peptidů CART potkanům se zvýší hladiny mRNA proteinu c-Fos, který je nepřímým indikátorem aktivity neuronů v mozku [74].

Také se zjistilo, že peptid CART(55-102) inhiboval vápníkové kanály v primární kultuře neuronů hipokampu, a spekulovalo se na jeho vazbu k receptoru spřaženému s inhibičním G-proteinem Gi/Go [82].

Kromě toho bylo publikováno, že po centrálním podání peptidů CART docházelo k fosforylaci CREB v některých neuronech hypotalamu, což by opět potvrzovalo vazbu peptidů CART ke GPCR [83]. Dalším účinkem peptidu CART byla fosforylace MAPK/ERK1/2 v hypofyzární buněčné linii AtT-20 [52, 84] (Obrázek 9). Ve studii Yoon a kol. [85] zabývající se vlivem peptidů CART na chování a lokomoci bylo pozorováno, že fosforylace MAPK/ERK1/2 vyvolaná kokainem byla inhibována peptidem CART(55-102) v ACB [85].

Bylo zjištěno, že ¹²⁵I-CART(61-102) se neváže k řadě známých receptorů (opioidní receptory, receptory pro somatostatin, progesteron, cholecystokinin, NPY, oxytocin, TRH a další) [86]. Byla provedena i vazebná studie s ¹²⁵I-CART(61-102) [86, 87] u hypofyzární nádorové buněčné linie AtT-20.



Obrázek 9. Navržené signální dráhy pro peptid CART, upraveno dle [1]. *Shrnutí ze studií zabývajících se buněčnou signalizací, ve kterých peptidy CART aktivovaly nejméně tři signální mechanismy. CART(55-102) inhiboval vápenaté kanály L-typu v neuronech hipokampu [82]. CART(55-102) aktivoval fosforylaci proteinu CREB v hypothalamických neuronech produkujících CRH u sytých a hladových myší [83]. CART(55-102) aktivoval fosforylaci MAPK/ERK1/2 v linii hypofyzárních buněk AtT-20 [84]. Přerušovaná šipka naznačuje, že u tohoto mechanismu není známo, zda je zprostředkován přes G proteiny. Hypotetický receptor pro peptid CART je zde znázorněn modře jako integrální membránový protein.*

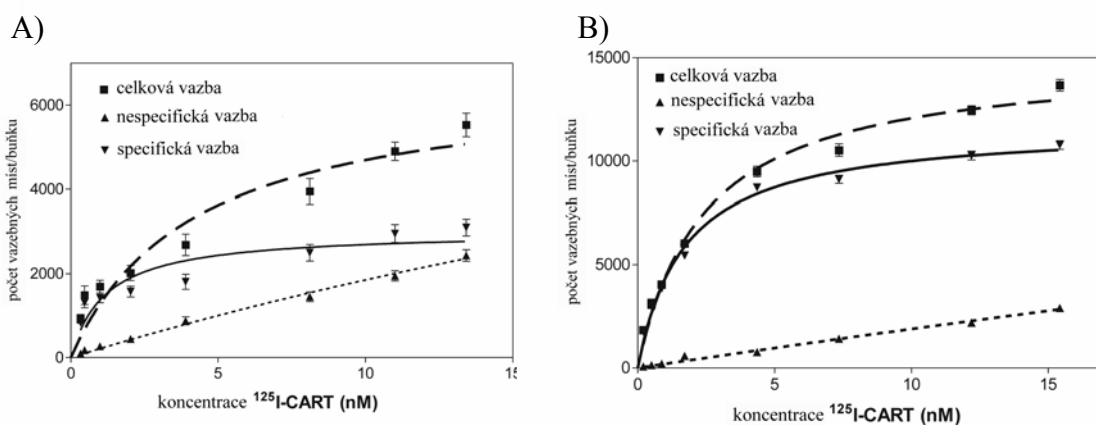
Fúzní protein skládající se z peptidu CART(55-102) a GFP (green fluorescent protein) byl vázán k disociovaným buňkám hypothalamu a hepatocytární buněčné linii HepG2 [88]. Fúzní protein po ICV podání myším signifikantně potlačoval příjem potravy, jeho biologická aktivita tedy zůstala částečně zachována [88].

V naší skupině byla publikována vazba peptidu CART k feochromocytomálním buňkám PC12, jak k nediferencovaným, tak i k diferencovaným v neurální fenotyp a buněčným membránám z těchto buněk [89]. Kompetitivní vazebné experimenty byly provedeny s ¹²⁵I-CART(61-102), který byl vytěšňován peptidem CART(61-102),

CART(55-102) a diiodovaným peptidem I_2 -CART(61-102) u nediferencovaných buněk PC12 a membrán z těchto buněk, a to s rovnovážnou disociační konstantou inhibujícího kompetitoru K_i v nízkém nM rozmezí. Biologická aktivita CART(61-102) zůstala zachována po jeho jodaci na diiodovaný I_2 -CART(61-102) [89]. Počet vazebných míst B_{max} u saturačních vazebných experimentů nediferencovaných buněk činil 2228 ± 529 vazebných míst/buňku a pro diferencované byl B_{max} dokonce pětikrát vyšší a to 11194 ± 261 vazebných míst/buňku. Rovnovážná disociační konstanta K_d , určená ze saturačních vazebných pokusů pro nediferencované PC12 buňky, činila 0,48 nM. Pro diferencované buňky měla K_d hodnotu 1,90 nM [89]. Výsledné saturační křivky pro diferencované a nediferencované buňky PC12 lze vidět na Obrázku 10.

V naší vazebné studii [89] s buněčnou linií PC12 nebyl ^{125}I -CART(61-102) vytěsněn žádným z následujících peptidů: CCK, α -MSH, TRH, angiotensin II, neurotensin, leptin. Identifikace receptorů peptidů CART, která by umožnila studium mechanismů a funkce peptidu CART, nebyla zatím úspěšná.

Vazba peptidu ^{125}I -CART(61-102) k primární buněčné linii připravené z potkaního nucleu accumbens [90] byla snížena v přítomnosti analogů GTP, na rozdíl od analogů ATP, které neměly na afinitu vliv. Toto zjištění může také poukazovat na to, že receptor pro CART je receptor spřažený s G proteinem [90].



Obrázek 10. Saturační vazba ^{125}I -CART(61-102) k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12 [89]. Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -CART(61-102) v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 2×10^{-6} M CART(61-102) při 37 °C po 30 minut. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby. Saturační vazebné křivky byly vypočítány metodou nelineární regrese pro a) nediferencované PC12 a b) buňky PC12 diferencované pomocí NGF v neurony.

1.4.5. Fragmenty peptidu CART

Přirozeně se vyskytujícími biologicky aktivními formami peptidu CART jsou: CART(55-102) a CART(61-102) [2], které vznikají účinkem prohormon konvertázy PC2 z propeptidu CART. V klasické práci Thima a kol. [2] peptidy CART(54-102), (55-102), (61-102) a (62-102) po ICV podání hladovým myším inhibovaly příjem potravy téměř stejně [2]; peptid CART(55-102) byl mírně účinnější než ostatní peptidy [2].

CART(1-26) a CART(1-27) jsou N-koncové fragmenty propeptidové části, které jsou považovány za biologicky neaktivní a slouží jako negativní kontroly pro fyziologickou funkci CART(55-102) [91]. Z nadledvin se podařilo izolovat delší formy peptidů CART, konkrétně CART(1-89) a (10-89) [91]. Peptid CART(10-89) inhiboval příjem potravy u myši po ICV podání [92]. Syntetické N-koncové fragmenty CART(55-76) a (62-76) po ICV podání inhibovaly příjem potravy u laboratorních potkanů, CART(62-76) s větším účinkem než CART(55-76). U C-koncového fragmentu CART(85-102) byla změřena schopnost snižovat lokomoci navozenou morfinem [92].

1.5. Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)

1.5.1. Objev a výskyt PrRP a receptor pro PrRP

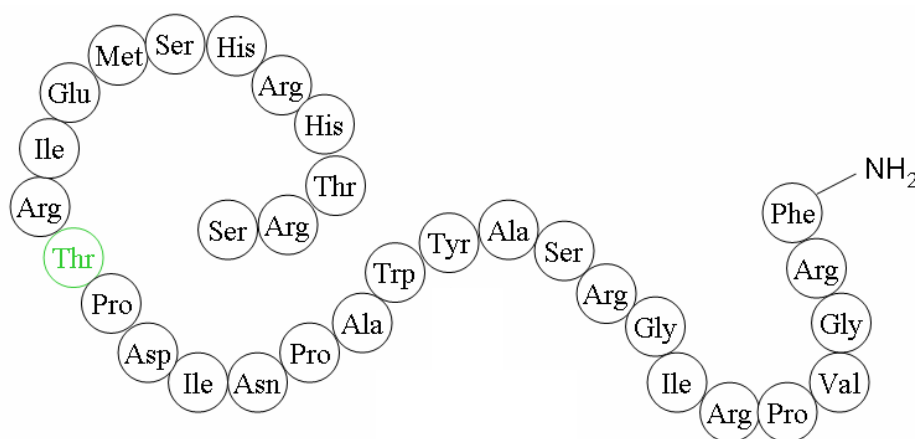
Peptid uvolňující prolaktin (prolactin-releasing peptide - PrRP) byl objeven jako endogenní ligand pro sirotčí receptor GPR10 nebo hGR3 (lidský) spřažený s G-proteinem (potkaní analog UHR-1) v roce 1998 Hinumou a kol. [93]. Byl nalezen v extraktu hovězího hypotalamu pomocí metody „obrácené farmakologie“, jako specifický faktor uvolňující prolaktin (PRL) z adenohypofýzy a proto byl pojmenován peptid uvolňující prolaktin. PrRP je exprimován v neuronech NTS, prodloužené míše a DMH, po aktivaci CCK [94]. Nejvyšší exprese PrRP byla lokalizována v A1/A2 regionech prodloužené míchy a v hypotalamu a pak v NTS, VMN, DMN. V periférii se PrRP nachází v plazmě, dřeni nadledvin [95] v menší míře ve slinivce břišní, varlatech, a v placentě [96]. Hladovění a laktace potlačuje expresi PrRP [97].

Receptor pro PrRP GPR10 je široce zastoupen v celém mozku, ale nejvyšší výskyt je v retikulárním jádru talamu, PVN, periventrikulárním jádru, DMH a NTS a v hypofýze, v periférii jen v dřeni nadledvin. PrRP má také poměrně vysokou afinitu k receptoru

neuropeptidu FF (NPFFR2) [98].

1.5.2. Struktura

PrRP vzniká z preprohormonu, který je u různých živočišných druhů tvořen různým počtem aminokyselin (98 aminokyselin u krávy, 87 u člověka, 83 u krysy a 82 u myši). Preprohormon může být štěpen na dvou různých místech, takže vznikají při posttranslačních úpravách dvě aktivní formy: PrRP31 (složen z 31 aminokyselin) a PrRP20 (složen z 20 aminokyselin). Struktura lidského peptidu je uvedena na Obrázku 11. Potkaní PrRP31 se liší od lidského ve čtyřech aminokyselinách, hovězí PrRP31 ve třech aminokyselinách [99].



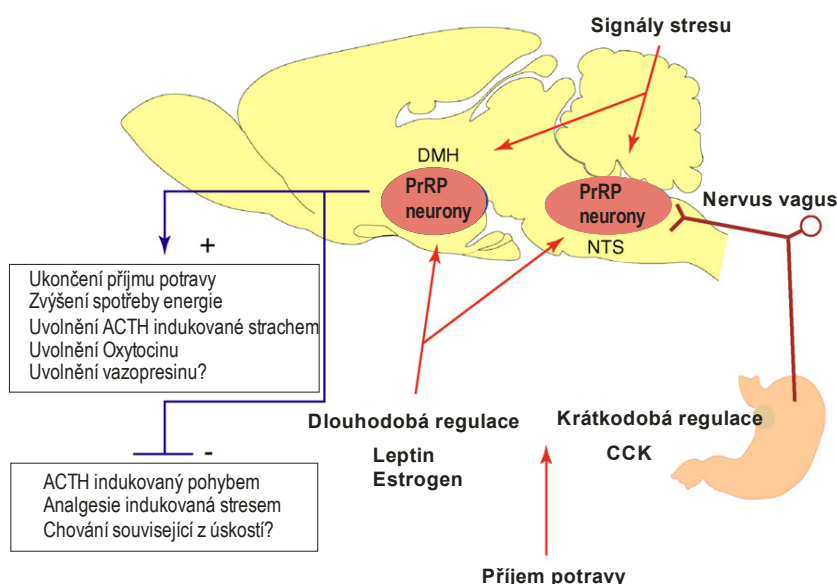
Obrázek 11. Lidský analog PrRP31. Zeleně zvýrazněný threonin označuje počátek PrRP20.

1.5.3. Fyziologická úloha PrRP

V úvodní studii Hinuma a kol. [93] prokázal, že PrRP specificky stimuloval sekreci prolaktinu z buněčné linie RC-4B/C (potkaní hypofyzární linie) a z primárních buněk adenohypofýzy kojících potkaních samic s účinností srovnatelnou s TRH. Morfologické a později fyziologické studie tento poznatek zpochybnily s tím, že PrRP nemůže působit na sekreci prolaktinu přímo, jelikož se nepodařilo prokázat imunoreaktivitu PrRP v eminenci

mediana, odkud se vyplavuje většina hypothalamických neuroendokrinních peptidů do adenohypofýzy [93]. Přesto se ukázalo, že PrRP stimuluje sekreci dalších hypofyzárních hormonů, ACTH, luteinizačního hormonu, hormonu stimulujícího folikuly, ale i oxytocinu a vazopresinu [100].

PrRP má v organismu více funkcí. Nedávno bylo prokázáno, že PrRP inhiboval příjem potravy u laboratorních potkanů [97], což naznačuje, že PrRP hraje roli v regulaci energetické rovnováhy. PrRP má také význam při aktivaci HPA osy, při regulaci stresu, krevního tlaku, při vnímání bolestivých podnětů apod. [101, 102].



Obrázek 12. PrRP v energetickém metabolismu a v reakci na stres. Dlouhodobě působící faktory jako je leptin a estrogen a krátkodobě působící, jako CCK, regulují pozitivně aktivitu neuronů PrRP. Červené šipky označují vstupní signály do PrRP neuronů a modré šipky označují výstupy z PrRP neuronů [94].

1.5.3.1. Vliv PrRP na regulaci příjmu potravy

Neurony se zvýšenou expresí PrRP přijímají nejen krátkodobé signály jako je od CCK, ale i dlouhodobé signály jako je od leptinu a estrogenu (Obrázek 12). Narušení interakce PrRP s GPR10 způsobuje hyperfagii, což vede k obezitě a poruchám metabolismu [94]. PrRP sjednocuje kontrolu energetického metabolismu a reakci na stres.

Vliv PrRP na krátkodobý příjem potravy vyplývá z toho, že CCK aktivuje většinu PrRP/noradrenergických neuronů v NTS a že CCK je neúčinný u myši deficitních na PrRP nebo GPR10 [103].

Bylo prokázáno, že ICV podání PrRP způsobí snížení příjmu potravy, a to nejen u sytých potkanů, ale i u hladových jedinců [97]. Zároveň dochází ke zvýšení tělesné teploty a k vyšší spotřebě kyslíku, což je ukazatelem zvýšeného energetického výdeje [104]. Při současném podání PrRP a leptinu dochází u potkanů k větší redukci příjmu potravy během noci, k většímu úbytku hmotnosti a k vyššímu výdeji energie [105].

Během hladovění a laktace se snižuje exprese PrRP [97]. Většina PrRP neuronů v mozkovém kmeni a hypothalamu obsahuje receptory pro leptin [105] a leptin stimuluje fosforylaci STAT3 v PrRP neuronech, zejména v DMH [106] (Obrázek 12). Exprese mRNA pro PrRP je nízká u obézních Zucker potkanů [105], kteří mají nefunkční leptinové receptory.

Estrogen je pravděpodobně také zodpovědný za regulaci PrRP neuronů v prodloužené míše, ale ne v hypothalamu [107]. U diabetických potkanů je exprese mRNA pro PrRP snížena, a podáním inzulínu se exprese mRNA pro PrRP navrácí na původní hladinu [94], což naznačuje, že také inzulín pozitivně reguluje expresi PrRP.

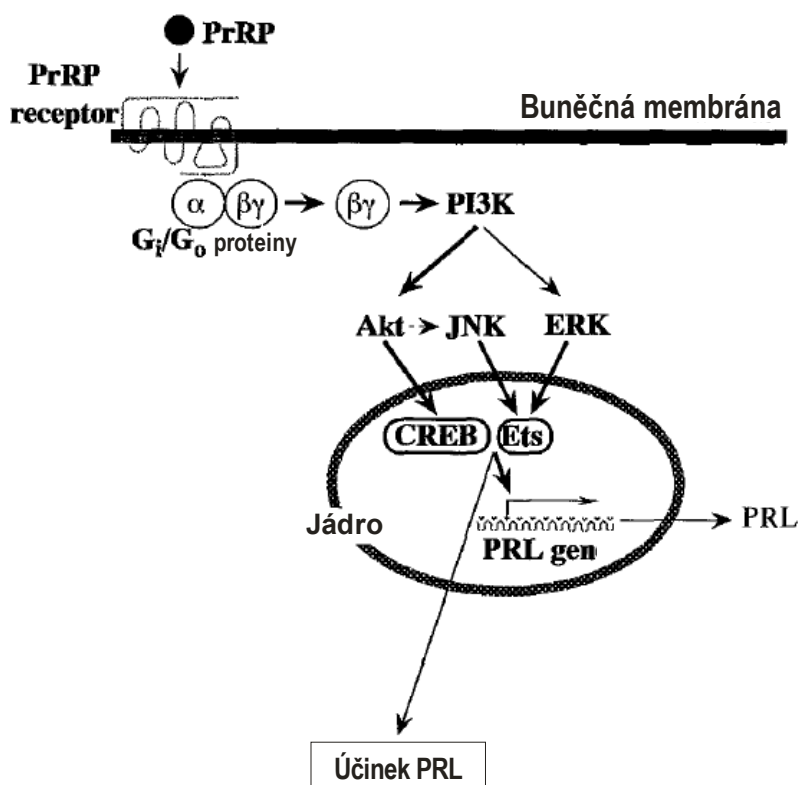
U PrRP-deficientních myši se v hypothalamu neobjevují žádné významné změny v expresi látek, které souvisí s příjmem potravy, jako jsou POMC, CART, AgRP, NPY a orexiny, což naznačuje, že tyto peptidy nemusí být hlavními následnými efekty PrRP [94].

1.5.4. PrRP a buněčná signalizace

Buněčná signalizace PrRP má dvě hlavní cesty, a to přes tyrosin protein kinázu MAPK/ERK1/2 (Mitogen-Activated-Protein Kinases/Extracellular signal – Regulation Kinase 1/2) a serin/threonin-proteinkinázu (Akt/proteinkinázu B) s následnou aktivací

transkripčních faktorů CREB (cAMP Response Element-Binding) a Ets (E-twenty six) [108, 109] (Obrázek 13).

Akt je hlavní činitel signální kaskády řízené fosfoinositid-3 kinasy (PI3K). Akt signalizace je spojena s přežíváním a růstem buněk, PrRP má funkci nejenom kontroly exprese PRL, ale také zachování počtu buněk produkujících PRL [110].



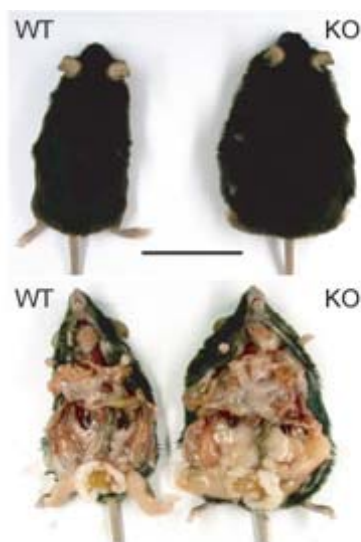
Obrázek 13. Signalizace PrRP [109]. Po aktivaci PrRP receptoru přes *Gi/Go* proteiny jsou přes PI3K aktivovány MAPK/ERK1/2 a Akt dráhy. Akt může aktivovat JNK (Jun N-terminal kinase), které pak fosforyluje Ets (E-twenty six – transkripční faktor). Ets je přímo aktivován ERK. Kromě toho Akt aktivuje CREB.

1.5.5. Myši s vyřazeným genem pro PrRP či GPR10

Myši s vyřazeným genem pro GPR10 receptor (GPR10 KO) mají v porovnání s normálními jedinci vyšší hmotnost, nižší energetický výdej, více tuku, avšak mají nižší příjem potravy [111]. U myši, které neměly funkční receptory GPR10, nebyl prokázán vliv PrRP, ale ani CCK na příjem potravy. Tento objev vedl k poznatku, že PrRP by prostřednictvím svého receptoru mohl být klíčovým prostředníkem pro funkci CCK, který

navozuje pocit sytosti po jídle [112]. Byl proveden experiment, kde myši (samci a samice) bez GPR10 receptoru měly ve věku 15 týdnů zřetelně vyšší váhu, než stejně staré myši kontrolní. Samice byly obéznější než samci i díky sníženému energetickému výdeji [111].

Myši s vyřazeným genem pro PrRP (PrRP KO) v dospělosti trpí hyperfagií, jsou obéznější než jedinci s funkčním genem pro PrRP a trpí glukosovou intolerancí a rezistencí k inzulínu [106] (Obrázek 14).



Obrázek 14. Myši s modifikovaným genem pro PrRP. *WT* (wild type) – myši s genem pro PrRP; *KO* – myši s vyřazeným genem pro PrRP [106].

1.5.6. PrRP a reakce na stres a bolest

Všechny stresové podměty jsou aktivovány v PrRP neuronech v NTS, DMH a v prodloužené míše (Obrázek 12). PrRP aktivuje vylučování kortikoliberinu (CRH), který pozitivně reguluje vylučování adrenokortikotropního hormonu (ACTH) [101], který dále reguluje vylučování glukokortikoidů (kortizolu a kortikosteronu) z kůry nadledvin.

Je však zřejmé, že úloha PrRP v neuroendokrinní reakci na stres je závislá na povaze stresujícího podnětu. Stresující podněty mohou vyvolat různé reakce a to nejen v neuroendokrinním systému, ale také v dalších systémech: v kardiovaskulárním (zvýšení krevního tlaku), metabolickém (změny v příjmu potravy, zvýšení spotřeby kyslíku, změna v metabolismu glukosy), v bolesti (analgezie nebo hyperalgezie – zvýšená citlivost na bolest) a v behaviorálním (úzkost, poruchy spánku) [94].

1.5.7. Analogy PrRP

V těle se přirozeně vyskytují peptidy PrRP31 a PrRP(13-31) neboli PrRP20, jejichž biologické účinky jsou srovnatelné. Peptidy vzniklé zkrácením PrRP20 od N-konce mají sníženou afinitu k receptoru; při nahrazení amidové skupiny za skupinu karboxylovou na C-konci peptidu pak došlo k úplné ztrátě schopnosti vázat se na receptor [113]. Nejkratší biologicky aktivní fragment je C-koncový PrRP(25-31) – heptapeptid, jeho účinek je však nižší ve srovnání s PrRP31 [113]. Boyle a kol. v zatím jediné strukturně-aktivitní studii analogů PrRP (19-31), neboli PrRP13 ukázali, že zvláště důležité pro biologickou aktivitu PrRP jsou Arg³⁰ a Phe³¹ [114]. Zatím však chybí antagonist PrRP, který by napomohl pochopení fyziologických funkcí PrRP.

1.6. Modely myší obezity

Zvířecí modely jsou jednou z významných složek biologického, lékařského, veterinárního a farmakologického výzkumu. Používají se z důvodů znalosti lidského a myšího genomu jako hlavní nástroj ke studiu obezity. Zvířata nám umožní získat odpovědi v krátkém čase, protože 10 dní v životě potkana či myši je přibližně 1 rok u lidí při srovnávání změny tělesné hmotnosti. Obezitu je možné u zvířat navodit pomocí změn neuroendokrinních, dietních a genetických. Jedním z prvních modelů obezity byl model s lézemi v ARC způsobenými glutamátem sodným u myši a potkanů [115]. Obezitu u zvířat lze dosáhnout také ovariektomií [116], krmením vysokokalorickou stravou (dietou vyvolaná obezita – DIO) [117], a genetickými manipulacemi (např. modely myši s vyřazeným genem) [118].

1.6.1. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)

Subkutánní (SC) - podkožní injekce glutamátu sodného (MSG) novorozeným myším způsobují zničení ARC v hypothalamu, což vede k rozvoji obezity [115]. MSG myši (myši, jejichž obezita je vyvolaná glutamátem sodným) se také vyznačují zmenšením oblasti ARC, rozšířením třetí mozkové komory a zúžením eminentia mediana [119]. Bylo zjištěno, že celkový počet buněk v ARC u MSG myši byl o 75 % nižší než u kontrolních myši, zatímco MSG významně neovlivnil počet buněk v dalších oblastech mozku [120]. MSG

snížil hladiny mRNA pro NPY a AgRP, (následek destrukce NPY/AgRP neuronů) [119]. MSG myši mají zvýšené sérové koncentrace leptinu, bývají asi o 10 % kratší než kontroly a jsou neplodné [115]. V naší studii jsme zjistili, že MSG myši měly až osmkrát více bílého tuku proti kontrolám, také se u nich rozvinula hyperglykemie a hyperinzulinémie [121].

1.7. Buněčné linie související s účinky peptidu CART a PrRP

1.7.1. Feochromocytální buňky PC12

Tato buněčná linie byla získána z potkaního feochromocytomu, nádoru chromafinních buněk z dřeně nadledvin [122]. Za běžných podmínek jsou nediferencované buňky kulovitého tvaru, podobné potkaním chromafinním buňkám. PC12 buňky pěstované v přítomnosti NGF se přestávají dělit, zastavují růst, podobají se sympatickým neuronům a vytvářejí nervovou síť [122]. Diferencované buňky vytvářejí shluky 30 až 120 nm dlouhých granulí a 30 až 70 nm dlouhých váčků (vezikul), které se podobají granulím a váčkům v neuronech, uvolňujících adrenalin a acetylcholin. Diferenciace je reverzibilní, neboť po odstranění NGF buňky do 24 hodin ukončují proces diferenciace a do 72 hodin se začínají opět dělit a vracet se ke svým původním vlastnostem [122].

Diferenciaci této buněčné linie v neurální fenotyp lze docílit i použitím peptidu PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) [123]. Působením syntetického glukokortikoidu dexamethasonu vyzrávají buňky PC12 v typický fenotyp normálních chromafinních buněk dřeně nadledvin, které vykazují zvýšenou aktivitu tyrosin hydroxylázy [124].

1.7.2. Hypofyzární buněčné linie (RC-4B/C, GH3 a AtT-20)

1.7.2.1. RC-4B/C

Epiteliální buněčná linie RC-4B/C byla získána ze tří roky starého nezhooubného nádoru přední hypofýzy potkaních samců [125]. Tato linie zahrnuje všech pět hypofyzárních typů buněk: somatotropy, laktotropy, gonadotropy, adenokortikotropy a tyreotropy, které produkují růstový hormon, prolaktin (PRL), luteinizační hormon (LH),

hormon stimulující folikuly (FSH), adenokortikotropní hormon (ACTH) a tyreotropin (TSH) [126]. Ze strukturálního hlediska jsou tyto buňky shodné s diferencovanými buňkami přední hypofýzy, avšak oproti hypofyzárním potkaním buňkám obsahuje tato linie o 20 % větší počet buněk produkujících LH a o 12 % méně buněk produkujících růstový hormon [125]. Počet buněk vylučujících PRL, FSH, ACTH a TSH je podobný ve vypěstované linii i potkaní hypofýze. Buněčná linie obsahuje o polovinu méně receptorů pro hormon uvolňující gonadotropiny (gonadotropins-releasing hormon – GnRH), přičemž afinita k jeho receptoru je stejná [126].

1.7.2.2. GH3

Epiteliální buněčná linie GH3 byla získána z potkaního zhoubného nádoru hypofýzy. Linie obsahuje buňky produkující růstový hormon, a to ve větší míře než primární hypofyzární buňky, a dále produkuje PRL [127]. Bylo zjištěno, že PrRP přes GPR10 receptor aktivuje v buňkách GH3 MAPK/ERK1/2, které zprostředkovávají signalizační kaskádu regulující aktivitu mnoha transkripčních faktorů [108].

Přidání epidermálního růstového faktoru (EGF) do živného média ovlivňuje růst buněčné linie [128]. Buňky GH3 exprimují dlouhou signalizující izoformu leptinového receptoru [129]. Tato linie byla hojně využívána pro studie regulace a charakterizace sodíkových, draslíkových a kalciových kanálů [130].

1.7.2.3. AtT-20

Hypofyzární buněčná linie AtT-20 pochází z myšího tumoru přední hypofýzy. Buněčná linie produkuje β -endorfin a ACTH. Přestože se schopnost produkce hormonu ACTH po nějaké době ztrácí, jsou buňky AtT-20 stále schopné vyvolat nádorové bujení u zdravých myší [131]. Buněčná linie AtT-20 je využívána pro zkoumání vylučování ACTH a β -endorfinů [131].

1.8. Vazebné experimenty

1.8.1. Teorie vazebných experimentů

Vazba ligandu na receptor je složitý proces, který zahrnuje také konformační změny. Vazebnými experimenty lze zjišťovat afinitu ligandu k receptoru a počet receptorů. Předpokladem vazebných experimentů je ustanovit rovnováhu mezi ligandem, receptorem a komplexem ligand-receptor [132]. Rovnováhy je dosaženo, když se vyrovná rychlost, při které vzniká komplex ligand-receptor, a rychlost, při které se komplex rozpadá. Veličina vztahující se k tomuto ději se nazývá rovnovážná disociační konstanta K_d [M] [132].

$$K_d = \frac{[ligand] \cdot [receptor]}{[ligand \cdot receptor]}$$

K_d je taková koncentrace ligandu, kdy je obsazena polovina receptorů. Je-li K_d nízká, pak je afinita ligandu k receptoru vysoká a je potřeba pouze malá koncentrace ligandu k navázání na receptor. Vysoká hodnota K_d značí nízkou afinitu ligandu k receptoru [132].

1.8.2. Specifická, nespecifická a totální vazba

Specifická vazba (B_{sp}) odpovídá množství radioligandu navázaného na určitý receptor. Vazba radioligandu na jiné místo než na receptor (převážně jde o interakce s membránou, vazbu na jiné receptory, vazbu na filtry) je označována jako nespecifická vazba (B_{nsp}) a stanovuje se při velkém přebytku neznačeného ligandu proti radioligandu. Po zablokování téměř všech specifických vazebných míst velkým přebytkem neznačeného ligandu se radioligand váže již jen na nespecifická vazebná místa. Celková vazba (B_t) udává celkové množství navázaného radioligandu bez přítomnosti neznačeného ligandu [132].

$$B_t = B_{sp} + B_{nsp}$$

↓

$$B_{sp} = B_t - B_{nsp}$$

1.8.3. Saturační vazebné experimenty

Saturační vazebné experimenty slouží k určení afinity ligandu k receptoru, která je charakterizována rovnovážnou disociační konstantou K_d , a k určení počtu receptorů (B_{max}). Saturační experimenty se provádějí při vzrůstající koncentraci radioligandu [132].

Pro vypočítání B_{sp} je nutné spočítat B_{nsp} pro každou koncentraci radioligandu. Experimentálně se určí B_{nsp} při každé koncentraci radioligandu a specifická vazba se pak vypočte jako celková vazba minus nespecifická vazba.

Hodnota nespecifické vazby by měla činit méně než 50 % z vazby celkové, v ideálním případě méně než 25 %, jinak je nutné upravit podmínky experimentu [132].

1.8.4. Kompetitivní vazebné experimenty

Kompetitivní vazba se provádí při konstantní koncentraci radioligandu v přítomnosti různých koncentrací neznačeného ligandu neboli kompetitoru, a to při splnění rovnovážných podmínek. Pomocí kompetitivních vazebných pokusů je stanovena hodnota EC_{50} (efektivní koncentrace 50, označovaná také jako IC_{50}), která značí koncentraci kompetitoru, při které je vytěsněna polovina radioligandu z vazebných míst [132].

K_i označuje rovnovážnou disociační konstantu neznačené látky a vypočte se podle rovnice Chenga a Prusoffa [133], je to koncentrace neznačeného ligandu, která se váže na polovinu vazebných míst v rovnováze za nepřítomnosti radioligandu či jiných kompetitorů [132].

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_d}} \quad [M]$$

Hodnota EC_{50} se stanoví kompetitivními vazebnými experimenty a hodnota K_d saturačními vazebnými experimenty, které byly provedeny za podobných podmínek jako kompetitivní vazebné experimenty [132].

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

- **Studium vztahu mezi strukturou a aktivitou fragmentů peptidu CART**

Peptid CART je neuropeptid vyskytující se v CNS i periférii a účastní se regulace příjmu potravy v hypothalamu, jehož receptor dosud není znám. Jedním z cílů této práce bylo studovat fragmenty tohoto peptidu jak v testech *in vitro* na feochromocytomálních buňkách PC12, tak *in vivo* v testu příjmu potravy u myší, a tak určit význam jednotlivých částí molekuly peptidu CART pro jeho vazbu k potenciálnímu receptoru a uchování biologické aktivity.

- **Studium vztahu mezi účinky peptidu CART a cholecystokininu (CCK-8) u štíhlých myší**

O vztahu peptidu CART a ostatních peptidů je velmi málo známo. CCK-8 je periferní peptid regulující příjem potravy v CNS, kde by mohl interagovat s peptidem CART. Vyslovili jsme hypotézu, že peptid CART a CCK-8 mohou synergisticky spolupracovat v regulaci příjmu potravy i aktivaci proteinu Fos jak v oblasti hypothalamu, tak v mozковém kmeni. Tyto předpoklady byly testovány u štíhlých myších samců.

- **Studium vztahu mezi účinky peptidu CART, CCK-8 a neuropeptidu Y (NPY) u štíhlých a obézních MSG myší**

Injekce glutamátu sodného (MSG) novorozeným myším způsobují selektivní léze v *nucleu arcuatu*, které vedou k pozdějšímu vývoji obezity a významným metabolickým změnám a inaktivitě CCK. Cílem práce bylo zjistit účinek peptidu CART a CCK-8 na příjem potravy u obézních MSG myší s nefunkčním ARC.

- **Charakterizace účinku analogů peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP) na hypofyzární buněčné linie**

PrRP je nedávno objevený neuropeptid, jehož hlavní funkce v organismu dosud není plně objasněna. V poslední době je spojován s regulací energetického metabolismu. Cílem práce bylo zjistit, zda hypofyzární buněčné linie GH3, AtT-20 a RC-4B/C obsahují receptor pro PrRP, a poté charakterizovat účinek analogů PrRP ve vazebných a funkčních testech *in vitro*.

3. MATERIÁL

Akt (pan) (C67E7) králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
BPTI	Sigma, St. Louis, MO, USA
BSA	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Buněčná linie – (PC12, RC-4B/C, GH3 a AtT-20)	Manassas, VA, USA
CART(54-102), (61-102)	Novo Nordisk, Kodaň, Dánsko
CCK-8	NeoMPS, Strasbourg, Francie
CREB (86B10) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Devazepid (Devazepide, L364,718)	Dar od ML Laboratories, Liverpool, VB
DMEM – high glukose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Duracrol	Spofa - Dental, ČR
EDTA	LACHEMA, Brno, ČR
EGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
EGTA	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
ELISA kit	BioVendor, Brno, ČR
FBS Standard quality	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Femto Pierce SuperSignal	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Fosfo-CREB (S133) (1B6)-myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)-myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7)-myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Fosfo-Akt (Ser473) (D9E)-králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
Glutamát sodný	Sigma, St. Louis, MO, USA
Goat serum	Gibco, Grand Island, NY, USA
HAM'S F-10	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
HIS Donor horse serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
HEPES	Sigma, St. Louis, MO, USA
Iodo-Gen	Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA
Ketamin	Spofa, ČR
L-glutamin 200mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko

Na(¹²⁵ I)	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
NGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
NPY	NeoMPS, Strasbourg, Francie
PEI	Sigma, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd	Sigma, St. Louis, MO, USA
Poly-L-lysin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Protimysí IgG peroxidázový konjugát	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protikráličí IgG peroxidázový konjugát	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Sigma, St. Louis, MO, USA
SDS-PAGE elektroforéza	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Standard dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, VB
Vector Stain Elite ABC kit	Burlingame, CA, USA
Xylazin	Spofa, ČR

Dále byly používány v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA.

4. METODY

4.1. Peptidy CART a jejich fragmenty a peptidy PrRP

Peptidy CART(61-102) a CART(55-102) byly zakoupeny od firmy Bachem (Bubendorf, Švýcarsko). Přehled struktur jejich krátkých fragmentů je v Tabulce 6 v kapitole výsledky 5.2.1. Fragmenty 1, 3, 4 a 6 byly syntetizovány na Univerzitě v Gdaňsku [134], zatímco fragmenty 2, 5 a 7 až 14 byly syntetizovány na pevné fázi [134] v Ústavu organické chemie a biochemie, AVČR, v.v.i., Praha. A jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulce 6.

Stejnou metodou zde byly syntetizovány peptidy PrRP31, PrRP20 a PrRP13, jejich struktura je uvedena v Tabulce 3. Všechny zkoumané peptidy byly rozpuštěny v deionizované vodě a uchovány v alikvotech v -20 °C.

Tabulka 3. Přehled testovaných analogů PrRP. *Peptidy byly syntetizovány metodou syntézy na pevné fázi.*

Analog	Sekvence
PrRP31	S-R-T-H-R-H-S-M-E-I-R-T-P-D-I-N-P-A-W-Y-A-S-R-G-I-R-P-V-G-R-F-NH ₂
PrRP20	T-P-D-I-N-P-A-W-Y-A-S-R-G-I-R-P-V-G-R-F-NH ₂
PrRP13	W-Y-A-S-R-G-I-R-P-V-G-R-F-NH ₂

4.1.1 Jodace peptidu CART(61-102) a PrRP31

Peptidy CART(61-102) a PrRP31 byly jodovány v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB AVČR, v.v.i., Praha. CART(61-102) byl jodován Na¹²⁵I (MP Biomedicals, Illkirch, Francie) s použitím Iodogenu (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) [135] v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,2 obsahujícím 0,15 M NaCl 15 minut při laboratorní teplotě. Separace nejodovaného, mono-jodovaného a di-jodovaného peptidu CART(61-102) byla provedena na RP-HPLC s použitím kolony Luna 3µm fenyl-hexyl 150x4.6mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) a 20 až 25 % gradientem acetonitrilu ve vodě s 0,1% trifluoroctové kyseliny po dobu 60 minut [134]. Molekulové hmotnosti jodovaných

peptidů byly měřeny na MALDI-TOF, Reflex IV hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

PrRP31 byl jodován Na^{125}I či NaI s činidlem Iodogen v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,2. Jodace probíhala 15 minut při pokojové teplotě. Radioaktivní nebo neradioaktivní nejodovaný, mono-jodovaný a di-jodovaný PrRP31 byly separovány pomocí RP-HPLC s použitím kolony Agilent Prep-C18 Scalar 5 μm , 250x4.6mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) a 20 až 30 % gradientu acetonitrilu ve vodě s 0,1% trifluoroctové kyseliny po dobu 60 minut. Jako mobilní fáze byl použit 20 až 30% gradient acetonitrilu ve vodě s 0,05 % kyselinou trifluoroctovou.

Mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) a ^{125}I -PrRP31 byly uchovávány v alikvotech při -20 °C a spotřebovány pro vazebné experimenty v průběhu jednoho měsíce.

4.2. Pěstování buněčných linií

Všechny buněčné linie byly zakoupeny od firmy ATCC (Manassas, VA, USA). Kultivace buněk probíhala za standardních podmínek pro pěstování buněčných linií. Buňky byly pěstovány v CO_2 inkubátoru (MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko), při teplotě 37 °C v atmosféře 95 % vzduchu a 5 % CO_2 . Do kultivačního média (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) byly přidány L-glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) a penicilin/streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko), obojí do konečné koncentrace 2 mM.

4.2.1. Pěstování buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20

Buněčné linie RC-4B/C a AtT-20 byly pěstovány v růstovém mediu DMEM o pH = 7,4, v mediu pro RC-4B/C bylo přidáno 10% fetální telecí sérum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) a 2,5 ng/ml epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor – EGF) (Sigma, St. Louis, MO, USA) a pro AtT-20 10 % koňského séra (Invitrogen Grand Island, NY, USA). Linie GH3 byla pěstována v růstovém mediu Ham's F-10 o pH = 7,4 s přidavkem 15% koňského séra a 2,5% fetálního telecího séra.

Pro vazebné pokusy jsme použili 24-jamkové destičky s průměrem jamky 15 mm (Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko), které byly potažené polyethyleniminem (PEI) (Sigma,

St. Louis, MO, USA). Buňky byly pěstovány tři dny do optimální hustoty 4×10^5 buněk na jamku a byly spočítány před pokusem i po něm v Bürkerově komůrce.

4.2.2. Pěstování buněčné linie PC12

Buněčná linie PC12 byla pěstována v růstovém médiu RPMI1640 o pH = 7,4 s přidavkem 10% koňského séra a 5% fetálního telecího séra. Pro dosažení exponenciálního růstu byla buněčná linie pasážována jednou týdně. K vazebným pokusům byly použity buď nediferencované buňky nebo PC12 buňky diferencované na neurony v přítomnosti nervového růstového faktoru o koncentraci 50 ng/ml média (Sigma, St. Louis, MO, USA) po sedm dní.

4.3. Izolace membrán z nediferencovaných buněk PC12

Buněčné membrány nediferencovaných buněk PC12 byly izolovány z buněk, které byly zamrazeny při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Buňky (přibližně 25 mil. buněk na izolaci) byly homogenizovány ve 30 ml izolačního pufru (20 mM HEPES pH 7,4, EDTA 2 mM) pomocí skleněného homogenizátoru s teflonovým dříkem desetkrát po dobu 30 sekund. Poté byla suspenze zředěna izolačním pufrům na 60 ml a opět homogenizována šestkrát po 30 sekund a odstředěna (centrifuga Jouan C3i/CR 3 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) po dobu 10 minut při $1000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl pak dále odstředěn (ultracentrifuga Beckmann OptimaTM L-00XP-Ultracentrifuga, typ rotoru 90-TI) po dobu 45 minut při $100000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sediment byl resuspendován v homogenizačním pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl_2) a alikvoty byly uchovány při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.1. Stanovení množství bílkovin

Koncentrace bílkovin byla stanovena podle Bradfordové [136]. Odpovídající koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky hovězího sérového albuminu (BSA). Výsledná hodnota pak byla průměrem tří koncentrací proteinu.

4.4. Provedení vazebných experimentů

4.4.1. Optimalizace podmínek vazebných experimentů

Podmínky vazebných experimentů na buňkách PC12 byly optimalizovány již dříve [89]. Pro vazebné experimenty na buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byla hledána optimální teplota a doba inkubace, optimální počet buněk na jamku a nakonec optimální složení vazebného pufru. Byla zkoušena inkubace při teplotách: 4 °C, 25 °C a 37 °C v časech: 30 až 180 minut s 50 – 500 tisíci buňkami na jamku. Následně byl zkoumán vliv přítomnosti 2 mM Ca^{2+} , 2 mM EDTA, nebo 2 mM EGTA a 0,1 mg/ml BPTI ve vazebném pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5mM MgCl_2 , 5,5mM glukosa a 1 mg/ml BSA)

4.4.2. Kompetitivní vazebné experimenty

Pro vazebné pokusy na buněčných liniích PC12, RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly použity 24-jamkové destičky s průměrem jamky 15 mm (Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko), které byly potažené PEI. Buňky PC12 nediferencované dosáhly optimální hustoty 5×10^5 buněk na jamku za dva dny. Diferencované buňky byly pěstovány na tuto hodnotu sedm dní, médium bylo měněno třetí a pátý den. Dále byly použity buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12. Buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly pěstovány tři dny do optimální hustoty 4×10^5 buněk na jamku.

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny podle principů Motulského a Neubiga [132]. Bylo použito duplikátů a pokusy byly provedeny alespoň třikrát pro každý peptid v různých koncentracích.

4.4.2.1. Kompetitivní vazba peptidu CART(61-102) na buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12

Kompetitivní vazebné pokusy byly provedeny v optimalizovaných vazebných podmínkách [89]. Vazebný pokus byl ukončen rychlou filtrací na Brandlově přístroji (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Byly použity filtry GF/C (Whatman, Maidstone, Velká Británie), které byly předem namočené v promývacím

pufru (10 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂ a 5,5 mM glukosa) s PEI (1g PEI/200 ml promývacího pufru). Radioaktivita vázaná na buňkách byla proměřena pomocí gama-čítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Celková vazba činila 3 až 10 % z celkové přidané radioaktivity. Nespecifická vazba v kompetitivních vazebných experimentech činila méně než 15 % z celkové vazby.

4.4.2.2. Kompetitivní vazba na celé buňky PC12 na destičkách

Vazebné pokusy s buňkami byly provedeny za stejných podmínek jako s buněčnými membránami (kapitola 4.4.2.1.). Destičky byly inkubovány s 10^{-10} M ¹²⁵I-CART(61-102) samotným nebo v kombinaci s analogy peptidů CART o koncentraci v rozmezí 10^{-11} – 10^{-3} M ve vazebném pufru o celkovém objemu 250 µl na jamku po dobu 30 minut při 37 °C. Po inkubaci byla každá jamka promyta promývacím pufrům a buňky solubilizovány v 0,1 M NaOH. Buněčné lyzáty byly odebrány do zkumavek, a radioaktivita vázaná na membrány byla změřena gama-čítačem. B_t činila 2 až 5 % z přidané radioaktivity. B_{nsp} v kompetitivních vazebných experimentech činila méně než 15 % celkové vazby. Linearita fragmentů 8, 12 a 13 (fragmenty s volnými cysteinovými zbytky) byla ověřena v simulovaných podmínkách před i po vazebných pokusech pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

4.4.2.3. Kompetitivní vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách

Buňky byly inkubovány s 10^{-10} M ¹²⁵I-PrRP31 samostatným nebo v kombinaci s neznačenými peptidy: PrRP31, PrRP20 a PrRP13 nebo I-PrRP31 o koncentraci v rozmezí 10^{-10} – 10^{-4} M v optimalizovaných podmínkách ve vazebném pufru o celkovém objemu 250 µl na jamku po dobu 60 minut při 25 °C. Po inkubaci byla každá jamka promyta promývacím pufrům a buňky solubilizovány jako v kapitole 4.4.2.2.

4.4.3. Saturační vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách

Stanovení B_t bylo provedeno ve vazebném pufru s koncentracemi ¹²⁵I-PrRP31 v rozmezí 0,5 – 8 nM v objemu 250 µl na jamku. Pro stanovení B_{nsp} pro jednotlivé

koncentrace značeného peptidu byl současně přítomen neznačený peptid PrRP31 v koncentrací 10^{-5} M. Vazba probíhala 60 minut při 25 °C. Po inkubaci byla jamka promyta promývacím pufrem a buňky byly solubilizovány jako v kapitole 4.4.2.2.

4.4.4. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika

Vazebné křivky byly vyhodnocovány pomocí programu Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA) s použitím modelu nelineární regrese za předpokladu jednoho vazebného místa. Vyhodnocením vazebných křivek byla získána hodnota IC_{50} . Inhibiční konstanty (K_i) byly spočítány dosazením IC_{50} do rovnice Chenga a Prusoffa [133]. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM). Statistika vazebných experimentů byla prováděna v metodou one-way ANOVA. Rozdíly byly považovány za významné, pokud $P < 0,05$.

4.5. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace

4.5.1. Sběr vzorků pro stanovení receptoru PrRP pomocí Western blotu u buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20

Buňky byly pěstovány po dobu 5 dní v lahvích 75 cm². Buňkám pak bylo odsáto médium a byly třikrát promyty promývacím pufrem (viz. kapitola 4.4.2.1.). Poté byl do každé lahve přidán solubilizační pufr (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% dodecylsulfát sodný (SDS), 0,01% bromfenolová modř, 5% β -merkaptoethanol, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4) a po 30 minutách v chladu byl lyzát buněk sklizen do mikrozkušavek a uchován v alikvotech při -70 °C.

4.5.2. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace (pMAPK/ERK1/2, pCREB a pAkt) na buněčných liniích RC-4B/C a PC12

Vzorky pro stanovení buněčné signalizace v těchto liniích byly připraveny z lyzátu buněk, které byly napěstovány na 6-jamkových nebo 24-jamkových destičkách potažených polyethyleniminem (PEI). Optimální hustota buněk byla 4×10^5 na jamku (24 jamková destička) a 9×10^5 na jamku (6 jamková destička).

Asi 18 hodin před pokusem bylo buňkám vyměněno médium za médium bez séra. Další den bylo u buněčné linie RC-4B/C do každé jamky přidáno buď samotné médium bez séra nebo PMA (phorbol-myristoyl-acetát; jako pozitivní kontrola), PrRP31, PrRP20, PrRP13, TRH vždy do konečné koncentrace 10^{-5} M. Obsah byl inkubován za stálého míchání při 37 °C 5 minut.

U buněčné linie PC12 bylo do každé jamky přidáno buď samotné médium bez séra nebo CART(61-102) 10^{-6} M, NGF 50 ng/ml, PACAP 10^{-7} M. Obsah byl inkubován za stálého míchání při 37 °C 10 minut. Po inkubaci byla reakční směs odsáta a promyta promývacím pufrům o teplotě 4 °C. Solubilizace byla provedena po dobu 5 minut v lyzačním pufru (viz. kapitola 4.5.1.). U buněk PC12 byl použit lyzační pufr bez NaF a Na_3VO_4 . Poté byly vzorky centrifugovány 15 min při 12000 x g a teplotě 4 °C. Alikvoty byly uchovány při -20 °C.

4.6. Metoda Western blot

4.6.1. SDS-PAGE

Elektroforéza v 4/12% ním polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Lyzáty buněk byly nejprve sonikovány dvě minuty, poté byly zahřívány při 100 °C dvě minuty a naposled byly centrifugovány pět minut při 500 x g a 25°C. U stanovení MAPK/ERK1/2 byla jako pozitivní kontrolní protein použita fosforylovaná MAPK (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA). Pro stanovení receptoru PrRP (GPR10) byl jako pozitivní kontrola použit lyzát Jurkat buněk. Následně byla prováděna elektroforéza, která probíhala při konstantním napětí ve dvou krocích, nejprve při 100 V po dobu 10 minut a poté při 150 V po dobu 50-60 minut.

4.6.2. Přenos proteinů na PVDF membránu a nitrocelulózovou membránu

Pro stanovení signalizačních fosforylovaných proteinů byly proteiny přeneseny z gelu na membránu PVDF-ImmobilonTM-P (Sigma-Aldrich, USA), pro stanovení GPR10 na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Přenos proteinů probíhal v

blotovacím pufru o pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol, s přidavkem 0,1% SDS při přenosu GPR10) při konstantním napětí 30 V v 6 °C přes noc.

4.6.3. Detekce proteinů na PVDF membráně a nitrocelulózové membráně

Po přenosu byly membrány promyty v promývacím pufru (TBS) (20 mM Tris, 140 mM NaCl) s 0,1% Tween-20 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly membrány inkubovány s blokujícím pufrem (5% netučné sušené mléko, TBS, 0,1% Tween-20, 5 mM Na₃VO₄ a 50 mM NaF) 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly třikrát promyty promývacím pufrem TBS po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány 1 hodinu s primární protilátkou (Tabulka 4) zředěnou blokovacím pufrem. Poté byly membrány třikrát promyty promývacím pufrem po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány se sekundární protilátkou (Tabulka 4). Následně byly membrány opět promyty třikrát po 5 minutách v promývacím pufru TBS. Postup byl proveden podle doporučeného protokolu firmy Cell signalling technology (Beverly MA, USA).

Chemiluminiscence po aplikaci činidla Femto (Pierce SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), byla detekována v CCD kameře LAS-3000 (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Germany).

Tabulka 4. Přehled protilátek a ředění pro stanovení pMAPK/ERK1/2, pAkt, pCREB a GPR10.

Protilátky	Základní látka
Primární GPR10	Myší-GPR10 králičí polyklonální Ab (Novus Biological, Littleton, CO, USA); ředění: 1:1000
Primární Fosfo MAPK	Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000
Primární MAPK	p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000
Primární Fosfo Akt	Fosfo-Akt (Ser473) (D9E) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:500
Primární Akt	Akt (pan) (C67E7) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:500
Primární Fosfo-CREB	Fosfo-CREB (S133) (1B6) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární CREB	CREB (86B10) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Sekundární proti myši	Peroxidázový konjugát připravený v králíku (Sigma, St.Louis, MO, USA); ředění: 1:1200
Sekundární proti králičí	Peroxidázový konjugát připravený v koze (Sigma, St.Louis, MO, USA); ředění: 1:12000

4.7. Stanovení hormonů v mediu buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20

Buněčné linie RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly pěstovány tři dny na hustotu 5×10^5 buněk/jamku. U buněčných linií GH3 a RC-4B/C bylo vyměněno médium za médium bez séra 2 h před pokusem. Poté bylo do každé jamky přidáno buď samotné médium bez séra, nebo PrRP31 či TRH na konečnou koncentraci 10^{-5} M, vždy v duplikátech. Inkubace probíhala 1h při teplotě 37 °C.

Po inkubaci bylo médium odebráno do zkumavek a centrifugováno 5 min při 500 x g a 4 °C (Jouan centrifuge C3i/CR 3 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Alikvoty byly uchovány v -20 °C. Vzorky byly po celou dobu práce uchovávány na ledu.

Stanovení uvolněných hypofyzárních hormonů v kultivačním médiu bylo provedeno pomocí kitu MILLIPLEXTM MAP (Millipore, St Charles MO, USA) podle pracovních protokolů od výrobce. Prolaktin byl dále měřen s pomocí RIA kitu rPRL (Izotop, Budapešť, Maďarsko).

4.8. Experimentální zvířata a obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)

Myši samci C57Bl/6 byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR při teplotě 22 ± 2 °C, měli volný přístup k potravě i pití; rytmus světlo/tma byl 12/12 hodin. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.).

Inbrední samci C57Bl/6 sloužili jako model štíhlých myši. Pro model obezity vyvolané glutamátem sodným byl novorozeným myším C57Bl/6 (chov ÚMG AV, ČR, Praha) injikován podkožně (SC) glutamát sodný (Sigma, St. Louis, USA) v dávce 4 mg/g hmotnosti myši denně od 2. do 8. postnatálního dne. Jako kontroly myši s obezitou vyvolanou MSG sloužily stejně staré myši. Myši byly krmeny standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Praha, ČR), která obsahovala 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků a jejíž energetická hodnota byla 3,4 kcal/g. Hmotnost myši a příjem potravy byly zaznamenávány pravidelně jednou týdně od 6. do 16. týdnu věku.

4.8.1. Odběr a hmotnost orgánů a krve/séra a jejich biochemické stanovení

Myši byly usmrceny cervikální dislokací a byla jim odebrána krev. Z celé krve bylo po oddělení krevního koláče získáno sérum po centrifugaci 15 minut při 3000 x g a 10 °C bylo sérum uchováno v alikvotech při – 20 °C.

Z myši byly odebrány tyto orgány: játra, mozky a tuk: nitrobřišní, gonadální a podkožní, tento tuk byl zvážen a spojen. Játra byla odebrána, zvážena a vizuálně byla zkoumána jejich struktura. Mozky byly odebrány na kontrolu, zda byly kanyly skutečně zavedeny do třetí mozkové komory. U MSG myši byla navíc změřena nasoanální délka a délka ocasu. Koncentrace leptinu v krevním séru byly stanoveny pomocí ELISA kitu

(BioVendor, Brno, Česká republika). Hladina glukosy byla změřena glukometrem (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japonsko).

4.8.2. Histologie mozku

Histologie mozku byla provedena u třech kontrolních a třech MSG myší. Po anestezii (IP ketamin/xylazin) (dávky viz kapitola 4.9.1.) proběhla perfuze perfuzním roztokem (0,1 M fosfátový pufr pH 7,4, obsahující: 4% paraformaldehyd, 0,1% glutaraldehyd a 10% kyselina pikrová). Mozky byly odebrány a uloženy do výše zmíněného fixačního roztoku na jednu noc při teplotě 4 °C. Poté byly inkubovány v 15% roztoku sacharózy v 0,025 M fosfátového pufru pH 7,4, 48 hodin při 4 °C. Před krájením byly mozky rychle zmrazeny v izopentanu (– 40 °C), poté byly umístěny do kryostatu (Reichert, Německo) na 1 hodinu při –17 °C. Řezy mozku o tloušťce 35 µm byly krájeny z celého hypotalamu pak přeneseny do studeného 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4, naneseny na podložní skla pokrytá poly-L-lysinem a barveny 0,1% roztokem kresolové violeti. Řezy byly analyzovány ve světelném mikroskopu Leica DMLS s použitím atlasu myšího mozku [137]. Reprezentativní řezy mozku byly zachyceny digitálním fotoaparátem Canon (PowerShot S 40).

Histologii mozku prováděli Zdeno Pirník, PhD. a RNDr. Alexander Kiss, DrSc. z Ústavu experimentální endokrinologie, SAV, Bratislava.

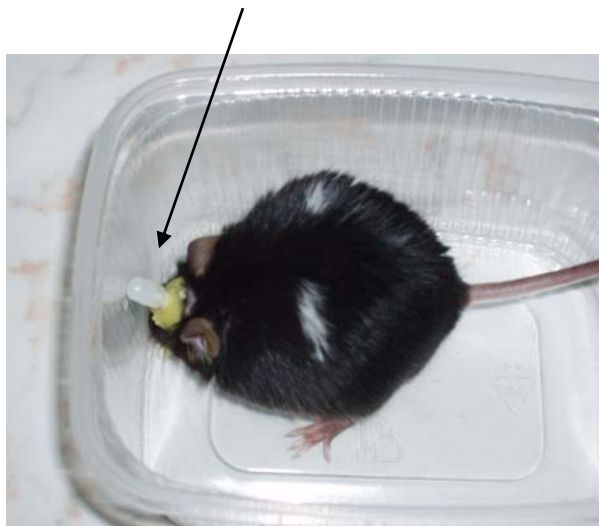
4.9. Stanovení příjmu potravy u myší

4.9.1. Zavedení ICV kanyl

Tato metoda byla provedena podle Maletínské a kol. [121]. Ve věku 16 týdnů byla kontrolním a MSG myším zavedena kanyla. Myši byly během operace v anestezii (IP injekce ketaminu/xylazinu: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg xylazinu (Spofa, ČR)). K fixaci hlavy byl použit stereotaxický přístroj a kanyla (Plastic One, Roanoke, VA, USA) byla zavedena do třetí mozkové komory (AP (*anterior posterior*) 2 mm od bregmy, V (vertikální) 3 mm). Okolo kanyly byla aplikovaná dentální pryskyřice (Spofa-Dental, ČR), rozpuštěná v duracrolu (Spofa-Dental, ČR). Po ztvdnutí pryskyřice byla vsunuta vnitřní kanyla, a to z důvodu ucpávání vnější kanyly (Obrázek 15).

Po operaci byly myši umístěny do samostatných klecí a měly týden na zotavení s volným přístupem k potravě a pití. Poté se prováděl pokus na příjem potravy. Při zavedení ICV kanyl do třetí mozkové komory jsme spolupracovali s RNDr. Renatou Haugvicovou, CSc., Chambon a. s. Praha.

Vnitřní kanyla zavedená do třetí mozkové komory.



Obrázek 15. Zavedení ICV kanyly do třetí mozkové komory

4.9.2. IP a ICV podání látek

Všechny látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. CCK-8 a jeho analogy podány IP individuálně nebo kombinovaně, CCK-8 - v dávkách 0,4 – 40 $\mu\text{g/kg}$ (0,2 ml/myš), devazepid a L365, 260 v dávce 1 mg/kg (0,2 ml/myš).

Individuální a kombinované ICV podání peptidu CART a nebo NPY bylo pro peptid CART(61–102) v dávkách 0,1 – 0,5 $\mu\text{g/myš}$ (5 $\mu\text{l/myš}$) a NPY v dávce 5 $\mu\text{g/myš}$ (5 $\mu\text{l/myš}$).

Kombinované podání NPY a CCK bylo provedeno tak, že nejdříve se NPY podával v dávce 5 $\mu\text{g/myš}$ (5 $\mu\text{l/myš}$) a následně po 45 minutách se podával IP CCK-8 v dávkách 0,4 – 40 $\mu\text{g/kg}$ (0,2 ml/myš). Dávkování látek je popsáno v Tabulce 5.

Všechny peptidy byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a byly injikovány za pomoci infuzní pumpy po dobu 20 sekund. Vnitřní kanyla byla ponechána na místě (ve třetí komoře) po dobu dalších 20 sekund, aby se zabránilo zpětnému refluxu.

4.9.3. Test příjmu potravy

Před pokusem byly myši v jednotlivých klíčkách a měly volný přístup k potravě i vodě. Před zahájením pokusu byly myši náhodně rozděleny do skupin po 6-8 myších.

V den pokusu byly myši buď hladové 17 hod (pokus 1) nebo syté (pokus 2) a pokus byl vždy zahájen zhruba v 8:00. Po ICV, IP nebo kombinované injekci (viz Tabulka 5) byla myším podána předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy se prováděl pravidelně po 30 nebo 60 min po dobu zhruba 6 hod. Během pokusu měly myši volný přístup k vodě. Každá koncentrace peptidu byla testována alespoň dvakrát. Každé zvíře bylo použito pouze jednou a pokus byl opakován s novou sadou myší.

4.9.4. Výpočty a statistika

Všechny parametry jsou prezentovány v tabulkách a grafech. Výsledky z příjmu potravy jsou vyhodnoceny v gramech příjmu potravy na myš. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pro zjištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami a jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM). Statistika byla prováděna metodou one-way ANOVA, po které pak následoval Tukey post hoc test. Hmotnosti myší byly hodnoceny metodou two-way ANOVA, ve které se hodnotily dva faktory: model myší obezity a týden věku. Pro výpočty byl použit program Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA). Rozdíly byly považovány za významné, pokud $P < 0,05$.

Tabulka 5: Schéma podání látek u myši v experimentu na příjem potravy. Čas = 0 min. – čas kdy byla myším dána vážená peleta.

Pokus 1: myši byly 17h hladové. Pokus 2: myši byly syté.

Pokus č.1							Schéma podávání látek hladovým myším	
Látka	Dávka	Čas podání	Látka	Dávka	Čas podání	počet		
	IP podání			ICV podání		zvířat		
Fyz. roztok		-20 min				8		
CCK-8	0.4 µg/kg	-20 min				6		
	4	-20 min				6		
			Fyz. roztok		-15 min	8		
			CART	0.1 µg/myš	-15 min	6		
				0.5	-15 min	6		
CCK-8	0.4 µg/kg	-20 min	CART	0.1 µg/ myš	-15 min	6		
	4	-20 min		0.1	-15 min	6		
	0.4 µg/kg	-20 min		0.5 µg/ myš	-15 min	6		
	4	-20 min		0.5	-15 min	7		
devazepid	1 mg/kg	-45 min				6		
	1	-45 min	CART	0.1 µg/ myš	-15 min	6		
	1	-45 min		0.5	-15 min	6		
L365,260	1 mg/kg	-45 min				6		
	1	-45 min		0.5	-15 min	7		

Pokus č.2									Schéma podávání látek sytým myším	
Látka	Dávka	Čas	Látka	Dávka	Čas	Látka	Dávka	Čas		
	ICV podání	podání		ICV podání	podání		IP podání	podání		
Fyz. roztok		-15 min								
			NPY	5 µg/ myš	-15 min					
CART	0.1 µg/myš	-15 min								
	0.5 µg/myš	-15 min								
CART	0.1 µg/ myš	-15 min	NPY	5 µg/ myš	-15 min					
	0.5 µg/ myš	-15 min	NPY	5 µg/ myš	-15 min					
						Fyz. roztok		-20 min		
						CCK-8	0.4 µg/kg	-20 min		
							4	-20 min		
			NPY	5 µg/ myš	-15 min	CCK-8	0.4 µg/kg	+30 min		
							4	+30 min		

4.10. Imunohistochemie

4.10.1. Podání látek, perfuze a zpracování mozkové tkáně

Pro stanovení Fos pomocí imunohistochemie byly myši přes noc hladové. Ráno jim byly podány látky: IP CCK-8, a nebo ICV CART (61-102) v dávkách a v časovém harmonogramu, jak je popsáno v kapitole 4.9.2. ($n = 5$). Šedesát minut po ICV podání byla myším IP podána anestezie (pentobarbital 50 mg/kg) a myši byly perfundovány perfuzním roztokem (viz. kapitola 4.8.2.). Pak byly mozky vyjmuty a zařazovány v perfuzním roztoku přes noc při teplotě 4 °C. Poté byly mozky vloženy na 48 hodin do 0,1 M fosfátového pufru s 30% sacharózou při teplotě 4 °C. Před krájením byly mozky rychle zmrazeny (20 sec) v izopentanu (– 40 °C), poté byly umístěny do kryostatu (Reichert, Německo) na 1 hodinu při – 17 °C. Umístění ICV kanyly ve třetí komoře bylo ověřeno při krájení. Řezy mozku o tloušťce 30 μ m byly přeneseny do studeného 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4 a uchovány jako volně plovoucí v chladu při 4 °C.

4.10.2. Imunohistochemie a barvení

Řezy mozku jako volně plovoucí sekce byly třikrát promyty v chladném 0,1 M fosfátovém pufru a následně byly inkubovány s 3% H₂O₂ po dobu 40 min při pokojové teplotě. Řezy byly opět promyty v 0,1 M fosfátovém pufru a dále inkubovány s králičí primární polyklonální protilátkou proti Fos proteinu (1:2000) v 0,1 M fosfátovém pufru (obsahujícím: 4% normální kozí sérum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0,5% Triton X-100 (Koch-Light Lab. Ltd, Colnbrook, Berks, Anglie), a 0,1% azid sodný) po dobu 48 hodin při 4 °C. Poté byly promyty fosfátovým pufrům. Promyté řezy byly inkubovány se sekundární biotinylovanou kozí protilátkou proti králičí IgG protilátce (1:500, VectorStain Elite ABC, vektorové Lab., Burlingame, CA, USA) po 90 min při pokojové teplotě. Opět byly promyty v fosfátovém pufru a pak následně inkubovány s avidin-biotin peroxidázovým komplexem (1:250) po dobu 90 min při pokojové teplotě. Poté byly promyty fosfátovým pufrům a pak 0,05 M acetátovým pufrům o pH 6.0. Následovala vizualizace Fos-IgG-ABC komplexu

pomocí 0,0266% 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridu (DAB) (0,0042% H₂O₂ a 2,5% síranu niklu amonného) v prostředí 0,05 M acetátového pufru.

4.10.3. Vyhodnocení

Pro vyhodnocení Fos imunoreaktivity v NTS, PVN, a DMH byl použit identický soubor myší. Fos imunoreaktivní buňky byly počítány v rámci NTS z Bregma - 7.48 mm do Bregma -7.32 mm, v PVN z Bregma -0,7 mm až -0.94 mm a v DMH z Bregma -1.46 mm na - 1.82 mm podle atlasu myšího mozku [137], a to zvláště v každé sadě řezů. Kvantitativní hodnocení bylo provedeno ze snímků pořízených digitálním fotoaparátem Canon (PowerShot S40) a světelným mikroskopem Leica DML. Sčítání Fos-pozitivních neuronů bylo provedeno manuálně dle popsaných podmínek (od každého zvířete byly počítány a analyzovány nezávislé a náhodné snímky).

4.11. Test pohybu ve volném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu „hot plate“

Vzdálenost, kterou myši urazily ve volném prostoru (ukazuje sedativní účinek látek), byla měřena pomocí systému VideoMot (TSE Systems, Bad Homburg, Německo). Myši měly před pokusem volný přístup k potravě i pití, byly umístěny samostatně ve volném prostoru (rozměry dna 1 x 1 m) a jejich pohybová činnost (tj. celková vzdálenost, kterou myš urazila), byla měřena po dobu 10 min. Myšim byl IP podáván CCK-8 (4 g/kg), devazepid (1 mg/kg) a ICV podáván CART(61-102) (0,1 a 0,5 µg/myš), nebo jejich kombinace s časovým harmonogramem, jak je popsáno v kapitole 4.9.2. (5 myší/skupinu).

Analgetická aktivita „hot plate“ horké plotny testuje bolest vyvolanou tepelným drážděním všech čtyř končetin. Myšim byly podávány stejné látky o stejné koncentraci a se stejným harmonogramem jako u testu pohybu ve volném poli (viz výše).

Statistika byla prováděna metodou one-way ANOVA, po které následoval Tukey post hoc test. Pro výpočty byl použit program Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA).

5. VÝSLEDKY

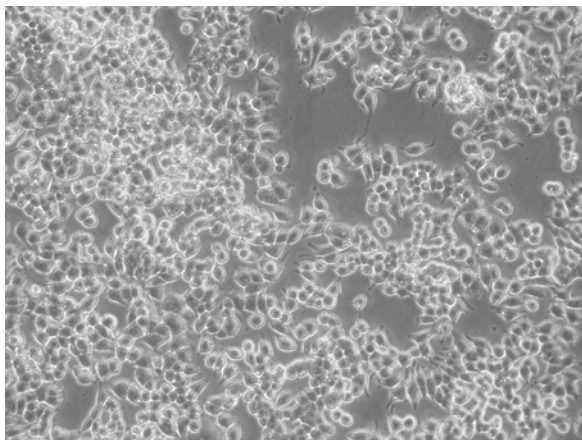
5.1. Buněčné linie

Buněčné kultury byly pěstovány za konstantních podmínek: sterilní prostředí, optimální teplota 37 °C , atmosféra 95 %vzduchu a 5% CO₂ a vhodné médium. Vazebné experimenty byly prováděny na celých buňkách pěstovaných na 24-jamkových destičkách. Pro sběr buněk na stanovení MAPK/ERK1/2, Akt a CREB byly použity 24-jamkové a 6-jamkové destičky. Pro dobrou adhezi buněk byly destičky potaženy PEI, čímž bylo po adhezi buněk na dně jamek zajištěno jejich homogenní rozložení a vyšší odolnost buněk při pokusu.

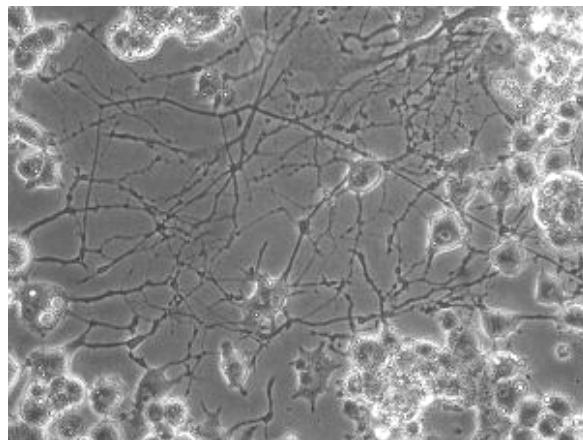
5.1.1. Buněčná linie PC12

5.1.1.1. Pěstování buněčné linie PC12

Buňky PC12 měly kulatý nebo polygonální tvar a sklon růst v malých shlucích, jak je vidět na Obrázku 16A. Buňky PC12 jsou citlivé na přítomnost NGF, po jeho přidání buňky tvořily axony a měnily se v neurální fenotyp (Obrázek 16B). Účinky NGF na PC12 buňky jsou reverzibilní. Diferencované buňky ztrácejí schopnost se měnit v neurální síť po 24 hodinách růstu v mediu bez NGF.



(A)

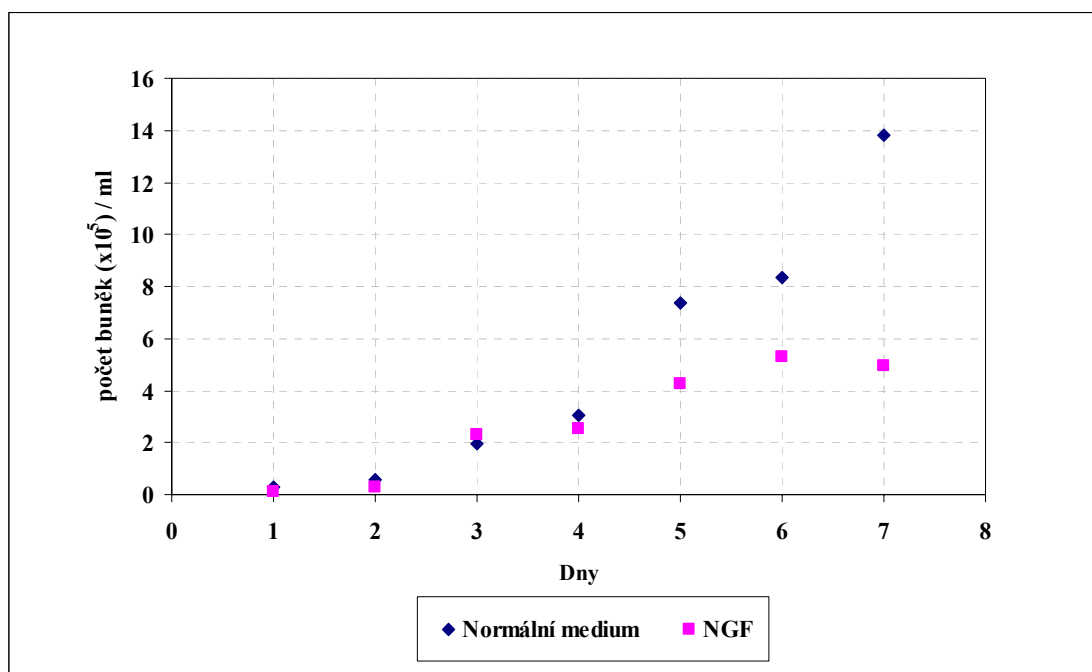


(B)

Obrázek 16. Buněčná linie PC12. (A) Nediferencované PC12, 6. den růstové křivky, hustota buněk 8×10^5 buněk/ml média. (B) Diferencované PC12, 6. den růstové křivky, hustota buněk 5×10^5 buněk/ml média (zvětšeno 20x).

5.1.2. Růstová křivka buněk PC12

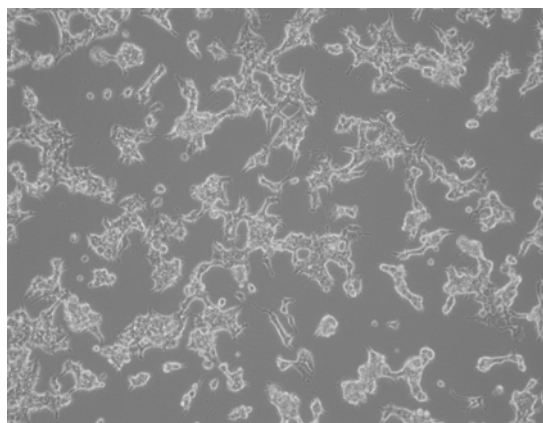
Byly měřeny růstové křivky buněk PC12 nediferencovaných a PC12 diferencovaných pomocí NGF (50 ng/ml). První den bylo do každé jamky nasazeno 40 tisíc buněk. Růstová křivka byla měřena po sedm dní. Nediferencované buňky rostly kontinuálně po celou dobu. Diferencované buňky rostly od čtvrtého dne pomaleji než nediferencované buňky a od šestého dne zastavily růst, jak je vidět na Obrázku 17.



Obrázek 17. Růstová křivka buněk PC12 nediferencovaných a diferencovaných pomocí NGF. Graf znázorňuje závislost počtu buněk/ml média na čase. Růstová křivka nediferencovaných buněk PC12 a diferencovaných buněk PC12 byla měřena od druhého do sedmého dne.

5.1.1.2. Pěstování hypofyzárních buněčných linií

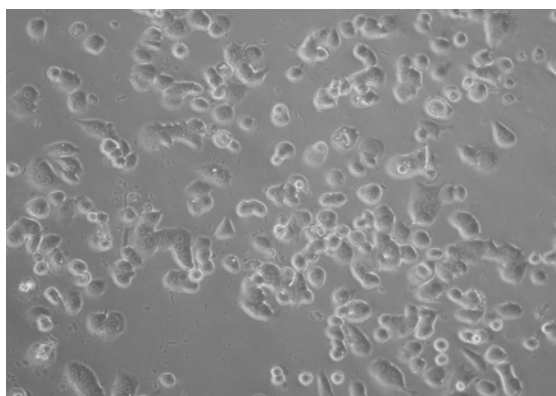
Buňky hypofyzárních buněčných linií RC-4B/C, AtT-20 a GH3 jsou znázorněny na Obrázku 18. Buňky RC-4B/C obsahují pět různých druhů buněk s různými tvary. Při dosažení vysoké hustoty rostly buňky ve vrstvách. Buňky AtT-20 byly protáhlého trojúhelníkového tvaru a tvořily shluky, při vysoké hustotě rostly ve vrstvách. GH3 buňky měly kulovitý tvar a sdružovaly se.



(A)



(B)



(C)

Obrázek 18. Buněčné linie RC-4B/C, AtT-20 a GH3. *Buněčná linie (A) RC-4B/C hustota buněk byla 3×10^5 buněk/ml média; (B) AtT-20 hustota buněk byla 5×10^5 buněk/ml média; (C) GH3 hustota buněk byla 4×10^5 buněk/ml média. Buňky byly vyfoceny po čtyřech dnech růstu (zvětšeno 20x).*

5.2. Strukturně aktivní studie fragmentů peptidu CART

5.2.1. Syntéza fragmentů peptidu CART

Přehled struktur fragmentů peptidu CART použitých v této studii je znázorněn v Tabulce 6 (viz níže) a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou publikovány v článku [134]. Peptidy byly syntetizovány metodou na pevné fázi za použití běžných protokolů [134]. Nalezené molekulové hmotnosti peptidů byly shodné s teoretickými a jejich čistota byla vyšší než 90%.

Peptid 1 je N-terminální hexapeptid CART(61-68). Peptidy 2-5 mají sekvenci části peptidu CART(61-102) odpovídajících úsekům mezi cysteiny 68-74, 74-86, 88-94, 94-101, kde byly cysteiny nahrazeny glyciny (peptidy 2-4) nebo glycinem a alaninem (peptid 5) (viz Tabulka 6). Peptidy 6 a 7 jsou cyklické analogy peptidu 3, které mají cysteiny jak na N-, tak na C-konci, liší se pouze v jejich C-koncové skupině, která je buď amid nebo volný karboxyl. Peptidy 9 a 10 mají sekvenci odpovídající úsekům 62 - 86, obsahují tři cysteinové zbytky, jeden z nich je chráněn trvale S- acetamidomethylem (Acm), tj. Cys (Acm)⁶⁸ v peptidu 10 a Cys (Acm)⁷⁴ v peptidu 9, tak je umožněn vznik disulfidových můstků ve dvou různých pozicích (Tabulka 6, Obrázek 21). Peptid 8 je lineární verze peptidu 9. Dalšími lineárními peptidy jsou peptidy 11 a 12, které se skládají z 15 aminokyselin a byly již publikovány [138, 139]. Peptid 11 obsahuje dva volné cysteiny, peptid 12 má cysteiny v pozicích 68 a 74 chráněny skupinou Acm, která tím zabezpečuje linearitu peptidu. A konečně, lineární peptid 13 a jeho cyklický derivát 14 odpovídá C-koncové části CART(87-102), oba tyto peptidy byly již publikovány Dylagem a kol. [92] a byly resyntetizovány na našem ústavu.

Tabulka 6. Přehled fragmentů peptidu CART. Číslování je odvozeno od pre-pro-peptidu CART, červeně jsou označeny cysteiny tvořící disulfidickou vazbu. Acm je zkratka pro acetamidomethyl, Abu pro kyselinu aminomáselnou.

	55	61	68	74	86	88	94	101		
CART (55-102)	VPIYEKKYGVPM	CD	DAGEQ	CAVRKGARIGKL	CD	CPRGTS	CNSFLLK	CL		
CART (61-102)	K	YGQVPM	CD	DAGEQ	CAVRKGARIGKL	CD	CPRGTS	CNSFLLK	CL	
1.		YGQVPM	-NH ₂							
2.			GDAGEQG	-NH ₂						
3.				GAVRKGARIGKL	G	-NH ₂				
4.					GPRGTS	G	-NH ₂			
5.						GNSFLLK	AL	-OH		
6.				CAVRKGARIGKL	C	-NH ₂				
7.				CAVRKGARIGKL	C	-OH				
		62								
8.		YGQVPM	CDAGEQ	C(Acm)	AVRKGARIGKL	C	-NH ₂			
9.		YGQVPM	CDAGEQ	C(Acm)	AVRKGARIGKL	C	-NH ₂			
10.		YGQVPM	C(Acm)	DAGEQ	CAVRKGARIGKL	C	-NH ₂			
11.		YGQVPM	CDAGEQ	CAV	-OH					
12.		YGQVPM	C(Acm)	DAGEQ	C(Acm)	AV	-OH			
13.					LA	DCPRGTS	Abu	NSFLLK	CL	-OH
14.					LA	DCPRGTS	Abu	NSFLLK	CL	-OH

5.2.2. Jodace peptidu CART(61-102)

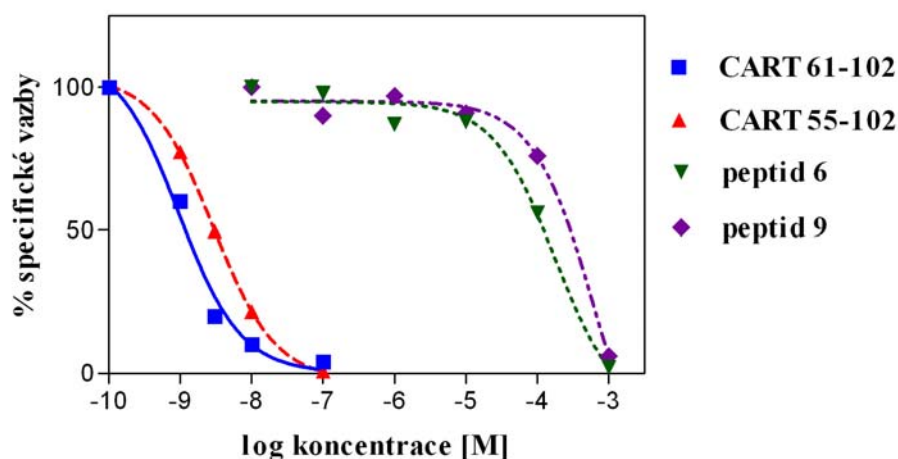
Peptid CART(61-102) byl jodován na Tyr⁶² radioaktivním izotopem ¹²⁵I nebo stabilním neradioaktivním jódem s použitím iodogenu. Pomocí HPLC byly nalezeny čtyři hlavní píky jak pro radioaktivně, tak neradioaktivně jodovaný CART(61-102). Píky byly identifikovány jako mono-jodovaný peptid s oxidovaným methioninem (v pozici 67), mono-

jodovaný peptid, di-jodovaný peptid s oxidovaným methioninem (v pozici 67) a di-jodovaný peptid, a to pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), kde mono-jodovaný CART(61-102) tvořil 50% z celkového množství peptidu. Původní peptid CART(61-102) nebyl ve směsi peptidů po proběhnutí reakce přítomen. Analýza jodovaného a nejodovaného peptidu CART(61-102) pomocí LC-MS/MS potvrdila oxidaci methioninu v pozici 67. Methionin se v průběhu jodace CART(61-102) iodogenem oxidoval na sulfoxid methioninu [134].

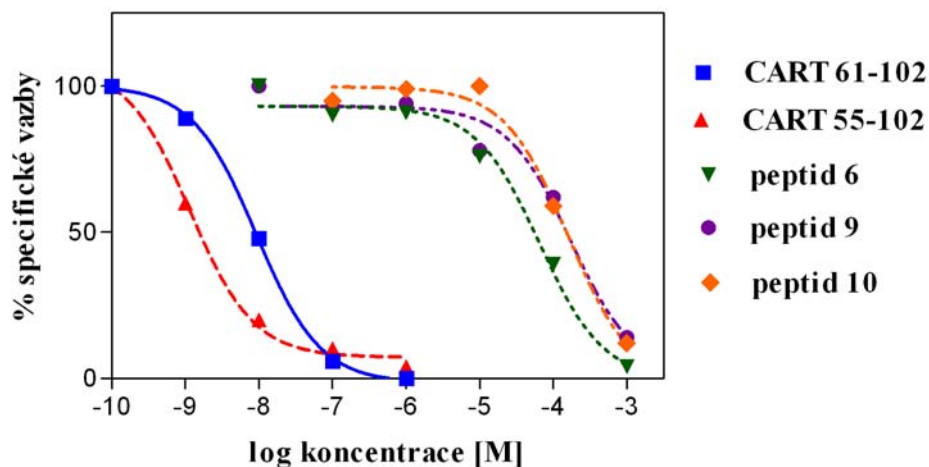
5.2.3. Kompetitivní vazba k nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám

Optimalizace podmínek pro kompetitivní vazebné pokusy na buňkách PC12 byla provedena již dříve [89]. Pro kompetitivní vazebné studie byly zachovávány stále stejné podmínky, tedy inkubace při teplotě 37 °C, 30 min s 50 µg proteinu zkumavku/(buněčné membrány) nebo 5×10^5 buněk/jamku (celé buňky na destičkách). Typické vazebné křivky na buněčných membránách z nediferencovaných buněk a nediferencovaných celých buněk jsou zobrazeny na Obrázcích 19 a 20. Výsledky experimentů vytěsnění radioaktivního ^{125}I -CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART(55-102) a fragmentů peptidů CART je popsáno v Tabulce 7.

V kompetitivních vazebných pokusech u nediferencovaných buněk PC12 a buněčných membrán se analogy CART(61-102) a CART(55-102) vázaly s inhibiční konstantou K_i v nízkých hodnotách v rozmezí 10^{-8} M, peptid 6 v rozmezí 10^{-5} M a peptidy 9 a 10 v rozmezí 10^{-4} M (viz Tabulka 7, Obrázek 19 a 20). Na Obrázku 21 jsou znázorněny struktury peptidů 6 a 9. Zbývající testované analogy nevytěsnilly ^{125}I -CART(61-102) ani v koncentraci 10^{-4} M.

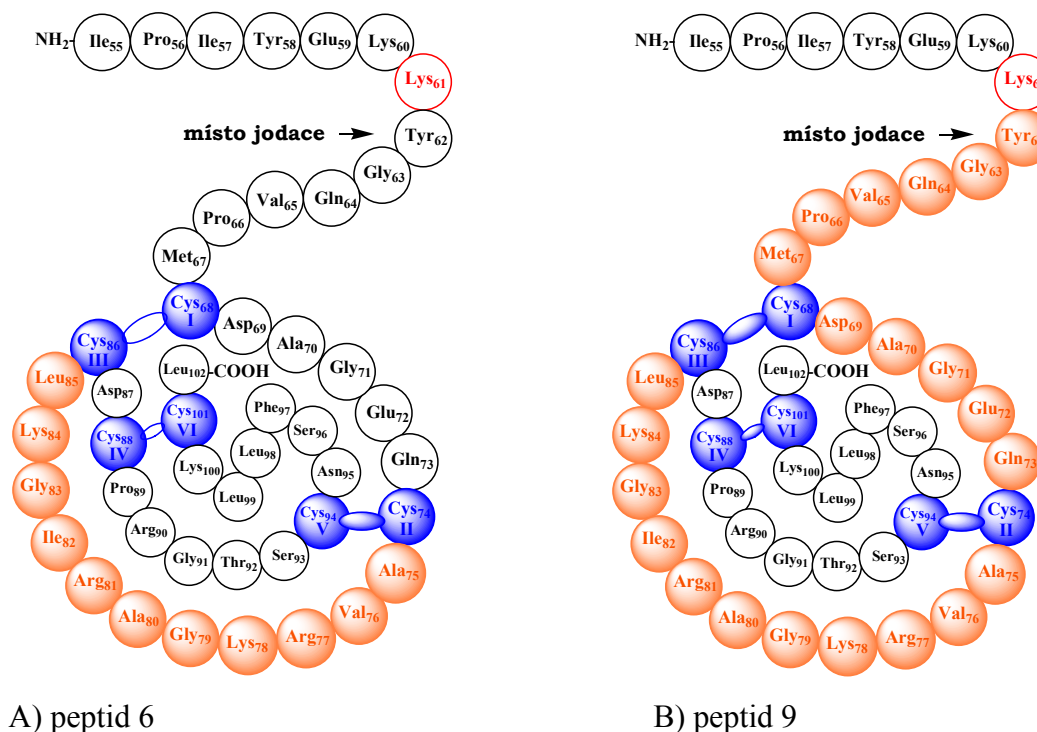


Obrázek 19. Kompetitivní vazebné křivky peptidů CART a jejich fragmentů k membránám z nediferencovaných buněk PC12. ^{125}I -CART(61-102) v koncentraci 10^{-10} M byl vytěsněn vzrůstající koncentrací analogů peptidu CART (30 min inkubace při 37 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-6} M CART(61-102)). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.



Obrázek 20. Kompetitivní vazebné křivky peptidů CART a jejich fragmentů k nediferencovaným buňkám PC12 ^{125}I -CART(61-102) v koncentraci 10^{-10} M byl vytěsněn vzrůstající koncentrací analogů peptidu CART (30 min inkubace při 37 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-6} M CART(61-102)). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla kontrolována před i po pokusu tvorba disulfidických můstků u peptidů CART a jejich fragmentů, která byla způsobená spontánní oxidací. Po inkubaci bylo pomocí hmotnostní spektrometrie naměřeno přibližně 10 % oxidované formy v látkách 8 a 11 a 20 % v případě peptidu 13.



Obrázek 21. Struktura fragmentů CART. (A) Struktura peptidu 6. Oranžovou barvou je znázorněna vnější strukturální smyčka mezi cysteiny 74 a 86, které jsou spojeny disulfidickou vazbou. (B) Struktura peptidu 9. Oranžovou barvou je znázorněna vnější strukturální smyčka mezi cysteiny, cysteiny v pozici 68 a 86 tvoří disulfidický můstek. Peptid 10 má stejnou strukturu jako peptid 9, neobsahuje však disulfidický můstek.

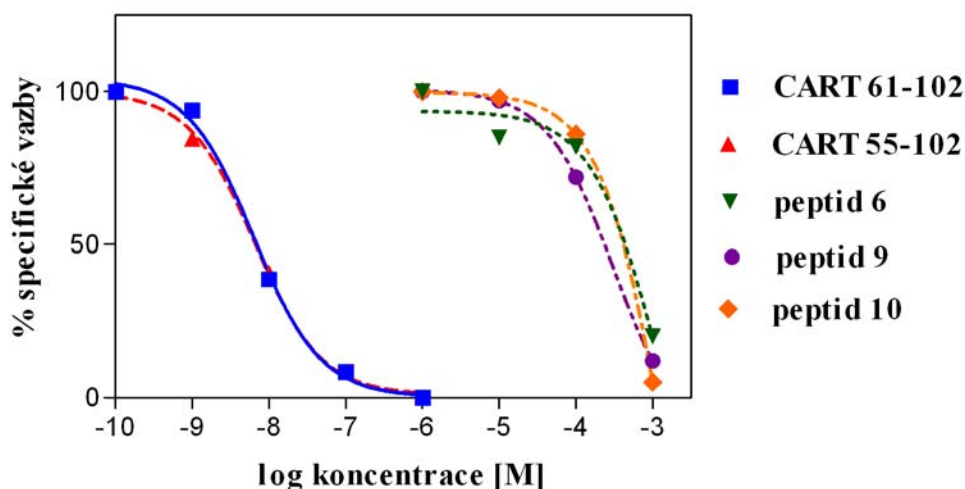
Tabulka 7. Vytěsnění radioaktivního ^{125}I -CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART (55-102) a fragmentů peptidu CART na buňkách PC12. Průměr \pm SEM z alespoň tří experimentů. K_i bylo vypočítáno z Cheng-Prusoffovy rovnice (K_d bylo 0,48 nM pro nediferencované buňky a 1,9 nM pro diferencované buňky [89]).

Peptid	K_i (M)		
	Membrány z nediferencovaných buněk PC12	Nediferencované buňky PC12 na destičkách	Diferencované buňky PC12 na destičkách
CART(61-102)	$(2.99 \pm 0.65) \times 10^{-9}$	$(1.36 \pm 2.62) \times 10^{-8}$	$(8.01 \pm 2.14) \times 10^{-9}$
CART(55-102)	$(2.98 \pm 0.33) \times 10^{-9}$	$(1.29 \pm 1.65) \times 10^{-8}$	$(5.40 \pm 0.44) \times 10^{-9}$
1	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
2	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
3	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
4	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
5	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
6	$(1.08 \pm 0.38) \times 10^{-5}$	$(7.29 \pm 2.64) \times 10^{-5}$	$(5.00 \pm 0.26) \times 10^{-4}$
7	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
8	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
9	$(3.98 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(3.96 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	$(4.09 \pm 0.06) \times 10^{-4}$
10	$(4.14 \pm 0.56) \times 10^{-4}$	$(1.62 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(1.26 \pm 0.35) \times 10^{-4}$
11	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
12	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
13	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$
14	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$	$>> 10^{-4}$

5.2.4. Kompetitivní vazba k diferencovaným buňkám PC12

Buněčná linie PC12 byla úspěšně diferencovaná v neurální fenotyp pomocí NGF, jak bylo popsáno dříve [122]. CART(61-102), CART(55-102) a fragmenty peptidů 9 a 10 se

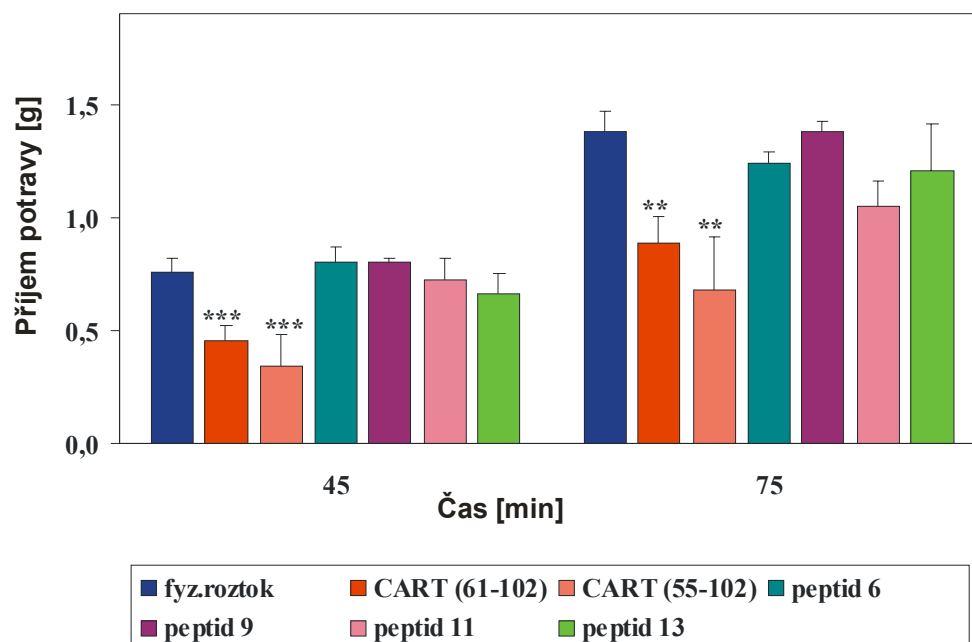
k diferencovaným buňkám vázaly s inhibiční konstantou K_i srovnatelnou s nediferencovanými buňkami, jak je vidět v Tabulce 7 a na Obrázku 22. Peptid 6 vytěsňoval vazbu ^{125}I -CART (61-102) na diferencovaných buňkách s K_i o jeden řád vyšší než pro nediferencované buňky (Tabulka 7).



Obrázek 22. Kompetitivní vazebné křivky peptidů CART a jejich fragmentů k diferencovaným buňkám PC12. ^{125}I -CART(61-102) v koncentraci 10^{-10} M byl vytěsňován vzrůstající koncentrací analogů peptidu CART (30 min inkubace při 37 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-6} M CART(61-102)). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.

5.2.5. Vliv fragmentů peptidu CART na příjem potravy

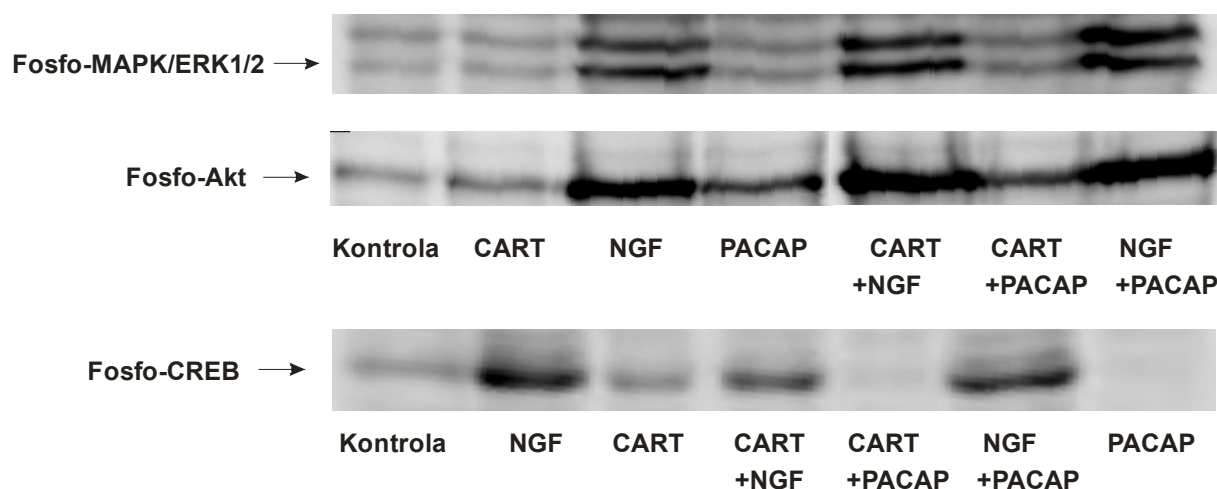
Účinky peptidu CART(61-102), CART(55-102) a peptidů 6, 9, 11 a 13 byly sledovány na myších samcích kmene C57Bl/6 po 17 hodinovém hladovění, jak je vidět na Obrázku 23. Peptidy byly podávány do třetí mozkové komory. ICV podání peptidu CART(61-102) v dávce 0,1 nmol/myš způsobilo pokles příjmu potravy, které odpovídalo již dříve publikovaným hodnotám [89]. Žádné z testovaných fragmentů peptidu CART neprokázaly žádné anorexigenní účinky i při 40krát vyšších dávkách, tj. 4 nmol / myš.



Obrázek 23. Účinek CART(61-102) a CART(55-102) a některých vybraných fragmentů peptidu CART na příjem potravy u hladových myších samců. *Přijem potravy byl sledován 45 a 75 min po ICV podání látek (největší účinek látek). CART(61-102) a CART(55-102) byly podávány v dávkách 0,1 nmol / myš, peptidy 6, 9, 11 a 13 v dávce 4 nmol / myš. n = 6-8 myši na skupinu. Signifikance je ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$ (látka vůči fyziologickému roztoku).*

5.2.6. Fosforylace MAPK/ERK1/2, CREB a Akt za pomoci metody Western blot na buněčné linii PC12

Buněčná linie PC12 byla pěstována za podmínek popsanych v metodách viz kapitola 4.2.2. Pro stimulaci buněk byly použity látky CART(61-102), NGF, PACAP a jejich kombinace. Buňky PC12 byly inkubovány s příslušnými látkami 10 minut při 37 °C. U stanovení pMAPK/ERK1/2, pAkt a p CREB byl jako pozitivní kontrola použit NGF a PACAP. Peptidy CART neměly zvýšenou fosforylaci oproti kontrole, jak je znázorněno na Obrázku 24.



Obrázek 24. Fosforylace MAPK/ERK1/2, Akt a CREB účinkem peptidu CART(61-102) a látek NGF, PACAP a jejich kombinací v nediferencovaných buňkách PC12. Buňky byly stimulovány CART(61-102) 10^{-5} M, NGF 50 ng/ml a PACAP 10^{-7} M po 10 minut při 37 °C. Lyzace buněk a metoda Western blot probíhala, jak je popsáno v metodách v kapitole 4.5.2. a 4.6.

5.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u myši

5.3.1. Vliv na příjem potravy

Synergistický účinek peptidu CART(61-102) a CCK-8 na příjem potravy byl sledován u myších samců kmene C57Bl/6 po 17 hodinovém hladovění. CCK-8 byl podáván IP a peptid CART(61-102) do třetí mozkové komory (ICV).

5.3.1.1. Příjem potravy po podání CART peptidu a CCK

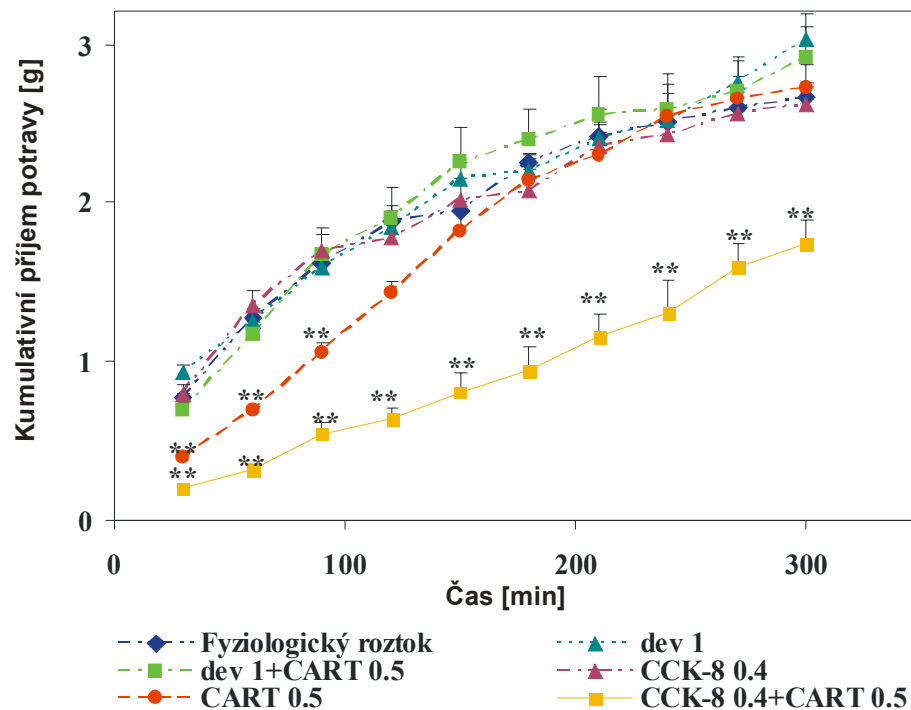
Kumulativní příjem potravy u hladových samců C57Bl/6 myši byl měřen po podání látek CART(61-102) a CCK-8 (všechny dávky a jejich kombinace látek jsou popsány v Tabulce 8) a je znázorněn na Obrázku 25. Příjem potravy po ICV a IP podání fyziologického roztoku nevykazoval žádný signifikantní rozdíl.

ICV podání peptidu CART(61-102) v dávce 0,5 µg/myš významně snížilo příjem potravy. Účinek peptidu CART byl krátkodobý, přibližně do 105 min po jeho podání, s maximálním účinkem mezi 45 a 75 minutami po ICV podání, tj. po prvním a druhém odečtu hmotnosti podávané potravy (Obrázek 25). Anorexigenní účinek peptidu CART(61-102) je závislý na dávce, jak je zřejmé na Obrázku 26A

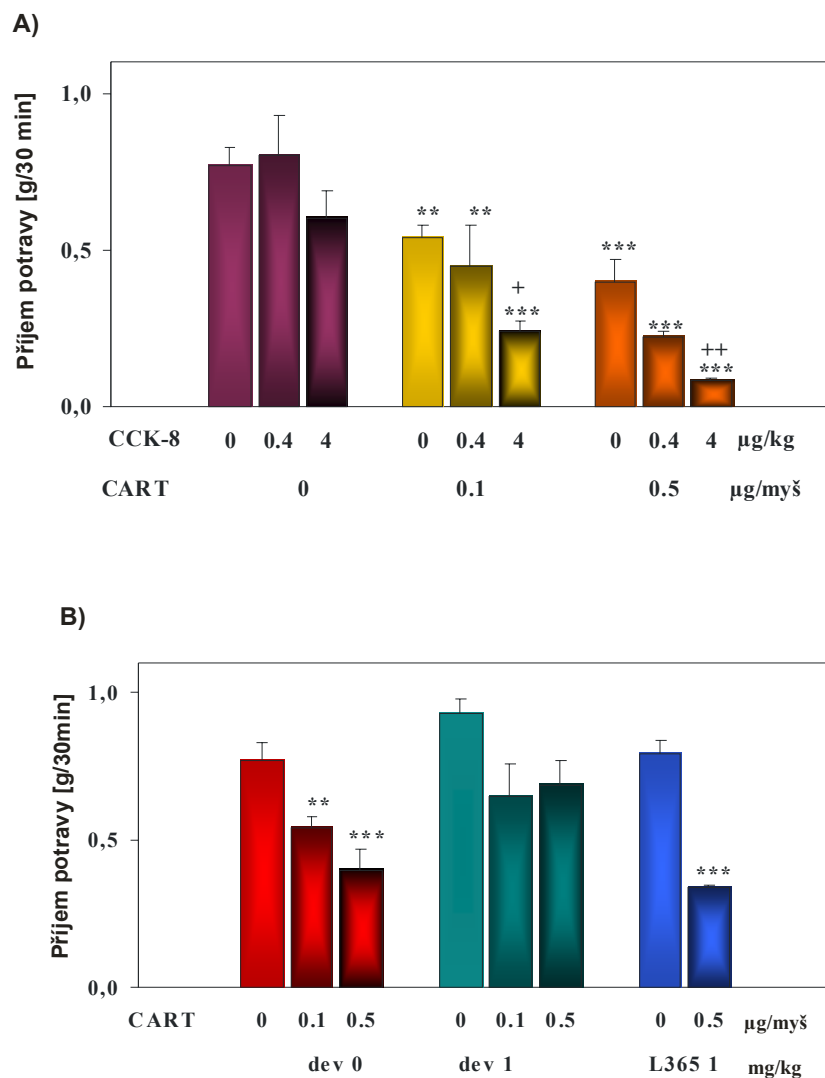
IP injekce CCK-8 v dávkách 0,4 a 4 g/kg nevýznamně snížila příjem potravy u hladových samců C57Bl/6, jednalo se tedy o dávky pod prahem účinku (Obrázek 26A). Kombinace CCK-8 (IP podání) s peptidem CART(61-102) (ICV podání, 5 minut po IP podání CCK-8) signifikantně snížila příjem potravy u hladových myší ve srovnání se samostatným peptidem CART(61-102) nebo CCK-8 (Obrázek 25 a 26A). Společný účinek těchto dvou látek trval déle než pět hodin (Obrázek 25), což ukazuje na synergistický účinek obou látek. V Tabulce 8 jsou shrnuty hodnoty pro příjem potravy v době maximálního účinku po podání peptidů (30 minut po přidání potravy).

5.3.1.2. Příjem potravy po podání CART peptidu a antagonistů CCK

Vyřazení CCK₁ receptoru jeho antagonistou devazepidem blokovalo anorektický účinek peptidu CART(61-102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 µg/myš), zatímco specifický antagonist receptoru CCK₂ L-365, 260 neovlivnil peptid CART snížení v příjmu potravy (Obrázek 26B a Tabulka 8).



Obrázek. 25. Kumulativní příjem potravy u hladových myších samců. *Myším byly podány: CCK-8 (IP podání, 0,4 $\mu\text{g/kg}$), devazepid (IP podání, 1 mg/kg) nebo fyziologický roztok (ICV), CART(61-102) (ICV podání, 0,5 $\mu\text{g/myš}$) a CCK-8 (IP podání, 0,4 $\mu\text{g/kg}$), CART(61-102) (ICV podání, 0,5 $\mu\text{g/myš}$) a devazepid (IP podání, 1 mg/kg), CART(61-102) (ICV podání, 0,5 $\mu\text{g/myš}$), $n = 6-8$ myši na skupinu. Signifikace je ** $P < 0,01$ (látka vůči fyziologickému roztoku).*



Obrázek. 26. Příjem potravy u hladových myších samců: *Myším byly podány: A) CCK-8 (IP podání, 4 a 4 g/kg) nebo fyziologický roztok (ICV podání), CART(61-102) (ICV podání 0,1 a 0,5 µg/myš), CCK-8 (IP podání, 0,4 a 4 g/kg) a CART(61-102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 µg/myš), nebo B) devazepid (IP podání, 1 mg/kg) samostatně nebo s CART(61-102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 µg/myš) a L365, 260 (IP podání, 1 mg/kg) samostatně nebo s CART(61-102) (ICV podání, 0,5 µg/myš). n = 6-8 myši na skupinu. Signifikace je ** P < 0,01, *** P < 0,001 (látko proti fyziologickému roztoku), + P < 0,05 proti CART(61-102) 0,1 µg/myš, ++ P < 0,05 proti CART(61-102) 0,5 µg/myš. CART - CART(61-102), dev - devazepid, L365 - L365, 260.*

Tabulka 8. Příjem potravy u hladových C57Bl/6 samců během prvních 30 min (maximální efekt) v experimentu 1 a 2. Signifikance je ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$ proti fyziologickému roztoku. ⁺ $P < 0,05$ proti skupině CART, 0,1 $\mu\text{g}/\text{myš}$, ⁺⁺ $P < 0,01$ proti skupině CART, 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$.**

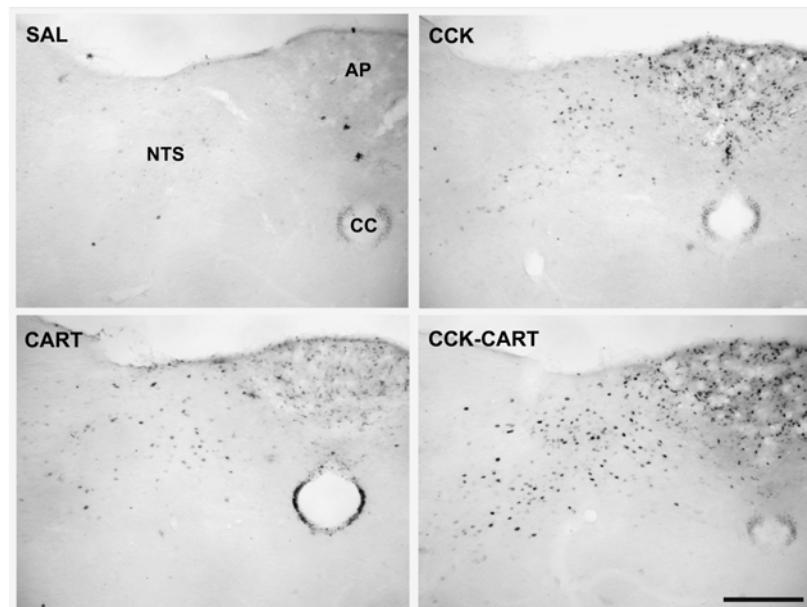
Látka/dávka				Příjem potravy/30 min (g \pm SEM)
IP podání		ICV podání		
Fyz. roztok		Fyz. roztok		0.77 \pm 0.06
				0.73 \pm 0.07
CCK-8	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CART		0.80 \pm 0.13
	4			0.60 \pm 0.09
			0.1 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.54 \pm 0.04 **
			0.5	0.40 \pm 0.07 ***
CCK-8	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CART	0.1 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.45 \pm 0.13 **
	4		0.1	0.24 \pm 0.03 *** ⁺
CCK-8	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CART	0.5 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.22 \pm 0.02 ***
	4		0.5	0.08 \pm 0.01 *** ⁺⁺
devazepid	1 mg/kg	CART		0.93 \pm 0.05
	1		0.1 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.65 \pm 0.11
	1		0.5	0.69 \pm 0.08
L365,260	1			0.79 \pm 0.05
	1		0.5	0.34 \pm 0.01 ***

5.3.2. Synergistický účinek CART peptidu a CCK při aktivaci c-Fos v hypothalamických jádrech

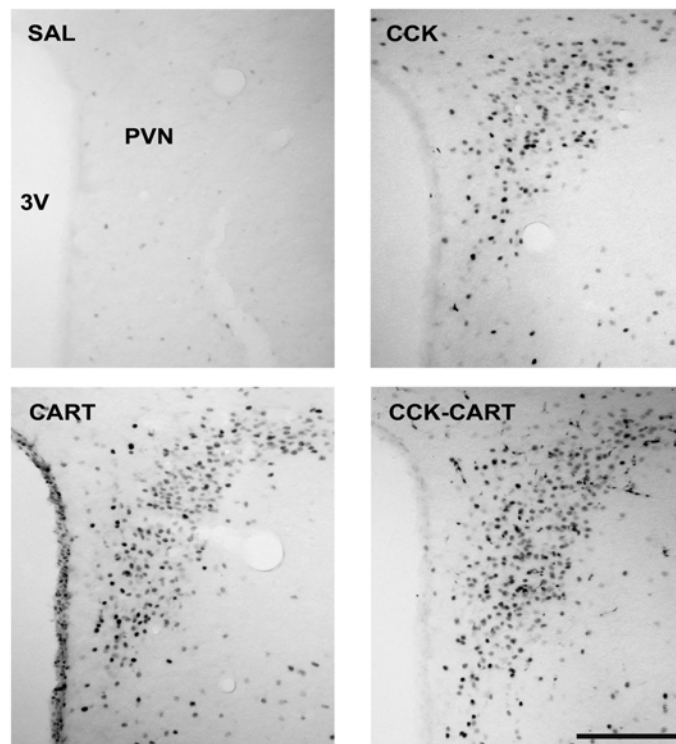
Pro stanovení proteinu Fos po působení CCK, CART peptidu nebo jejich kombinace v hypothalamických jádrech byla použita imunohistochemie. Byly použity dávky CCK-8 (IP podání, 4 g/kg) a CART(61-102) (ICV podání, 0,1 µg/myš), stejně jako v testech příjmu potravy (Tabulka 9) [140, 141]. Statistická analýza, která byla provedena testem one-way ANOVA, ukazuje vliv jednotlivého podání látek CCK-8, CART(61-102) a jejich kombinace. Fos imunopozitivní buňky byly detekovány v NTS ($F_{3, 16} = 26,23$, $p < 0,000001$), PVN ($F_{3, 13} = 100,35$, $p < 0,000001$), a DMH ($F_{3, 12} = 58,19$, $p < 0,000001$) (Obrázek 27). Počet imunoreaktivních buněk v NTS po podání fyziologického roztoku u kontrol byl minimální, jak je vidět na obrázku 27A. Počet Fos imunoreaktivních buněk se výrazně zvýšil po IP podání CCK-8 (0,4 µg/kg) v porovnání s podáním fyziologického roztoku ($P < 0,05$) (Obrázek 27 A, D). Podobný, ale statisticky nevýznamný nárůst byl pozorován po ICV podání CART(61-102) (0,1 µg/myš).

Post hoc test ukázal významný vliv na aktivaci Fos buněk ($P < 0,01$) po společném podání CCK-8 a peptidu CART v NTS ve srovnání s účinkem na všechny ostatní podané látky (Obrázek 27 A, D). Fos imunoreaktivita v PVN a DMH měla podobný trend jako v NTS. U kontrolních myši byl Fos signál slabý (Obrázek 27 B, C). Zvýšení Fos imunoreaktivity bylo po aplikaci CCK-8 ($p < 0,01$), peptidu CART(61-102) ($p < 0,01$), a nebo po společném podání CCK-8 a CART(61-102) ($p < 0,01$) ve srovnání s kontrolní skupinou (fyziologickým roztokem) myši signifikantní (Obrázek 27 B, D). Post hoc test odhalil výrazně vyšší zvýšení počet Fos-imunopozitivních buněk v PVN a DMH po podání peptidu CART(61-102) ve srovnání s aplikací CCK-8 (Obrázek 27 B, C); souběžné použití výše uvedených peptidů ($p < 0,01$) aktivuje Fos v PVN a DMH výrazněji než každý peptid sám ($p < 0,01$).

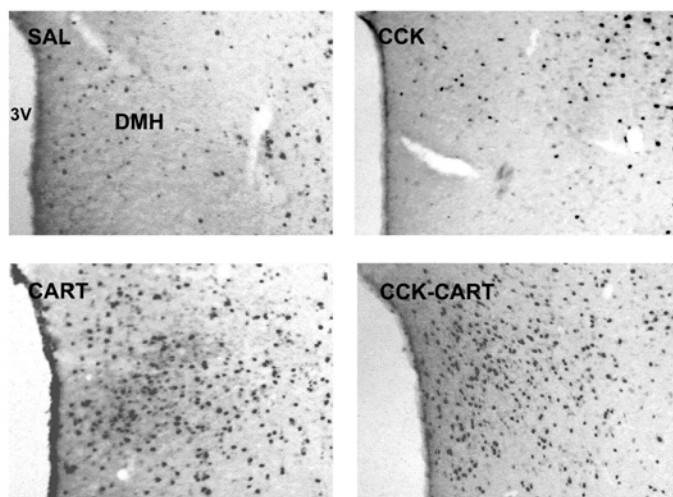
A)



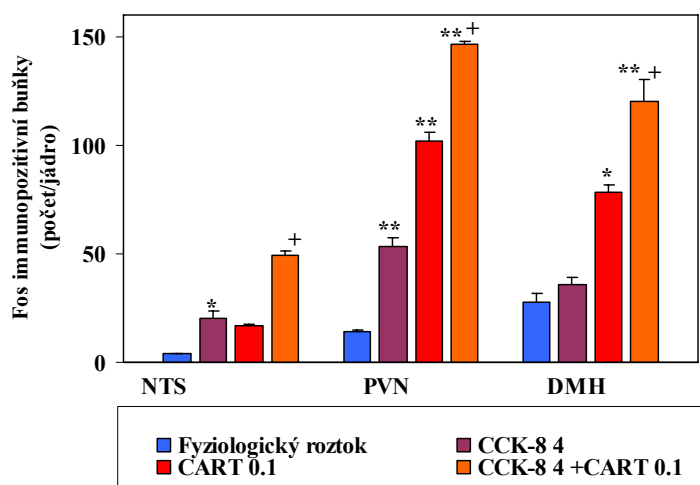
B)



C)



D)

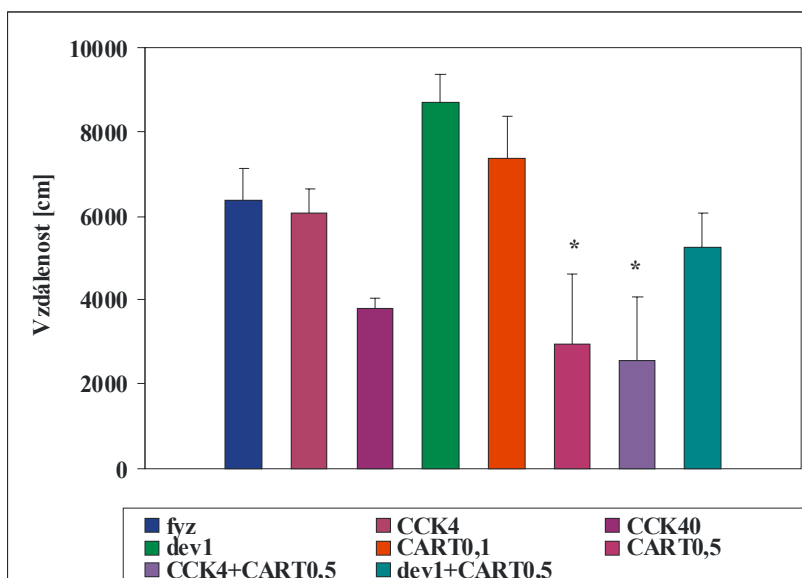


Obrázek 27. Fos imunoreaktivita: Fos-imunobarvení buněk v koronální části A) NTS, B) PVN, C) DMH, D) Počet Fos-imunopozitivních buněk v NTS, PVN a DMH po 60 minutách po podání látek, fyziologického roztoku (SAL, ICV podání), CCK-8 (IP podání, 4 g/kg), CART(61-102) (ICV podání, 0,1 μ g/myš), a jejich kombinace ($n = 4-5$ myši na skupinu a $n = 5-6$ sekci na skupinu). Signifikance je + $P < 0,01$ proti fyz. roztoku, CCK a CART, * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ proti fyz. roztoku. SAL – fyziologický roztok, AP - area postrema, úsečka = 100 μ m.

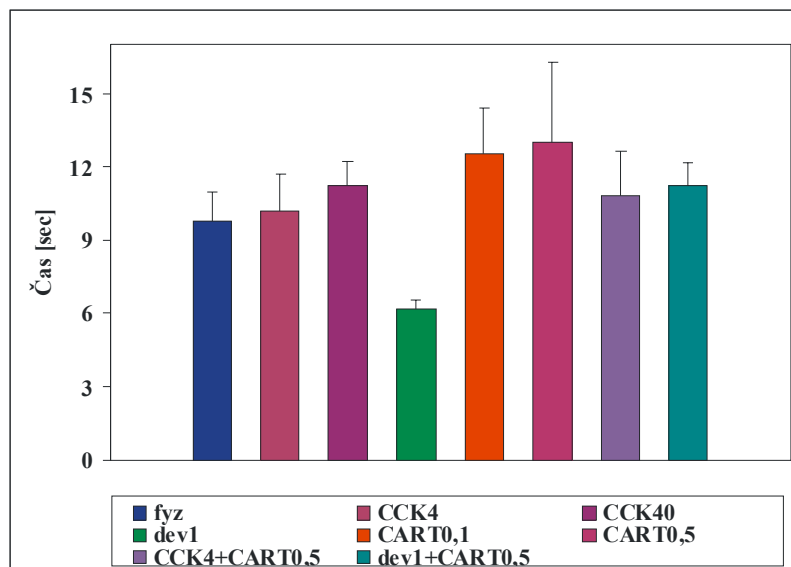
5.3.3. Sedativní a analgetické účinky peptidu CART a CCK

Behaviorální účinky byly měřeny po podání peptidu CART a CCK-8 – každého zvlášť a jejich kombinaci. Pomocí testu open field (pohyb v otevřeném poli) a analgetickém testu hot plate (horká plotna) byly měřeny na myších po 10 minutách po ICV podání peptidu CART(61-102), po IP podání CCK-8 a devazepidu nebo jejich kombinace (viz Výsledky kapitola 5.3.). Cílem této metody bylo zjistit, jaký další vliv na chování mají peptidy CART a CCK-8 kromě účinku na příjem potravy. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 28A, kde je vidět, že peptid CART (0,5 μ g/myš) samostatně nebo v kombinaci s CCK-8 (4 g/kg) výrazně snížil uběhnutou vzdálenost v sledovaném poli ve srovnání se skupinou injikovanou fyziologickým roztokem. Na Obrázku 28B je znázorněno, za jak dlouho myš vyskočí v reakci na test horkou plotnu. Antagonista CCK₁ receptoru devazepid potlačil sníženou pohybovou činnost po aplikaci peptidu CART, jak je vidět na obrázku 28A.

A)



B)



Obrázek 28. Behaviorální účinky u kontrolních myši A) test otevřeného pole, celková vzdálenost, kterou myši urazí za 10 min a B) analgetický test na horké plotně po IP podání CCK-8 (4 $\mu\text{g/kg}$) nebo devazepidu (1 mg/kg), po ICV podání fyziologického roztoku nebo peptidu CART(61-102) (0,1 a 0,5 $\mu\text{g/myš}$), nebo po kombinaci injekcí IP CCK-8 nebo devazepidu a následně ICV podání peptidu CART(61-102). Signifikace je ** $P < 0,01$ oproti fyziologickému roztoku. Peptid CART - CART(61-102), dev - devazepide, L365 - L365, 260.

5.4. Anorektický efekt CCK a peptidu CART v modelu štíhlých a MSG myší

5.4.1. Stanovení biochemických parametrů v séru

MSG model myší obezity byl charakterizován u samců inbredních C57Bl/6 myší (Obrázek 29). Samci C57Bl/6 byli po narození injikováni po dobu 1 týdne glutamátem sodným. Ve věku 16 týdnů byli MSG samci těžce obézní, i když jejich průměrný denní příjem potravy byl nižší než u neošetřených kontrol (3.62 ± 0.23 g proti 4.07 ± 0.16 g). MSG myši nejvíce akumulovaly subkutánní, abdominální a gonadální tuk, až 8krát více než kontroly. MSG myši měly zhruba o 15 % kratší tělo a ocas než kontroly.

U C57Bl/6 kontrolních a MSG myší byly stanoveny sérové hladiny leptinu, a glukosy. Hladiny leptinu byly významně zvýšeny u MSG samců oproti kontrolním myším. Na druhou stranu, hladiny glukózy u MSG myší se nijak nelišily od kontroly (Tabulka 9).

Tabulka 9. Metabolické parametry u C57Bl/6 MSG samců ve věku 16 týdnů. *Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ($n = 20-25$). Signifikace je *** $P < 0,001$ proti kontrolám.*

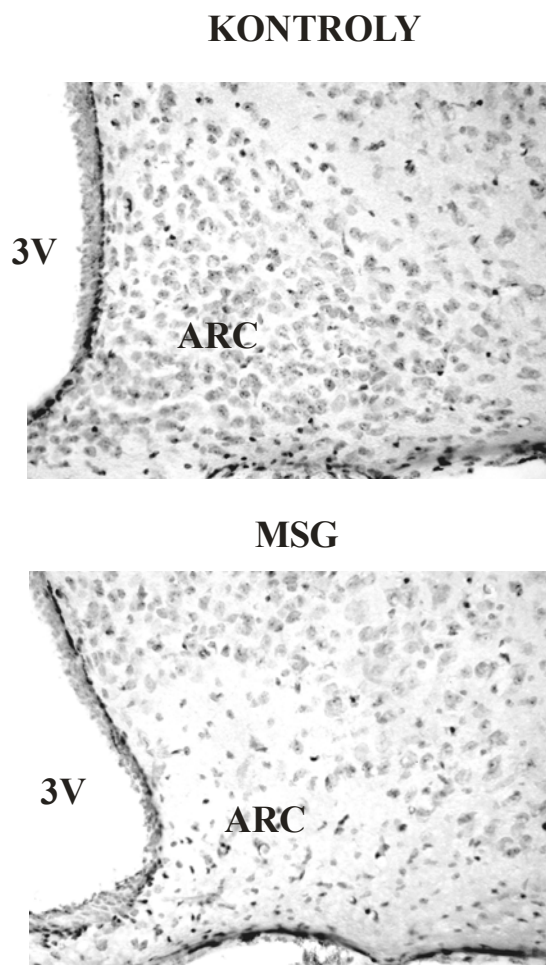
Charakterizace	Průměr tuk/tělesná hmotnost	Glukosa (mM)	Leptin (ng/ml)
Kontroly	1.41 ± 0.41	8.20 ± 0.64	7.00 ± 1.21
MSG	13.48 ± 0.99 ***	7.88 ± 0.62	45.55 ± 6.54 ***



Obrázek 29. Model myší obezity na kmeni C57Bl/6 vyvolaný glutamátem sodným (MSG)

5.4.2. Histologie mozku

Histochemie koronálních sekcí hypotalamu u MSG myši prokázala zánik neuronů v oblasti ARC ve srovnání s kontrolami, tj. že existují specifické léze v ARC u MSG myši (Obrázek 30), zatímco v přilehlých hypotalamických jádrech nebyly žádné známky poškození. U kontrolních myši byl ARC beze změny.



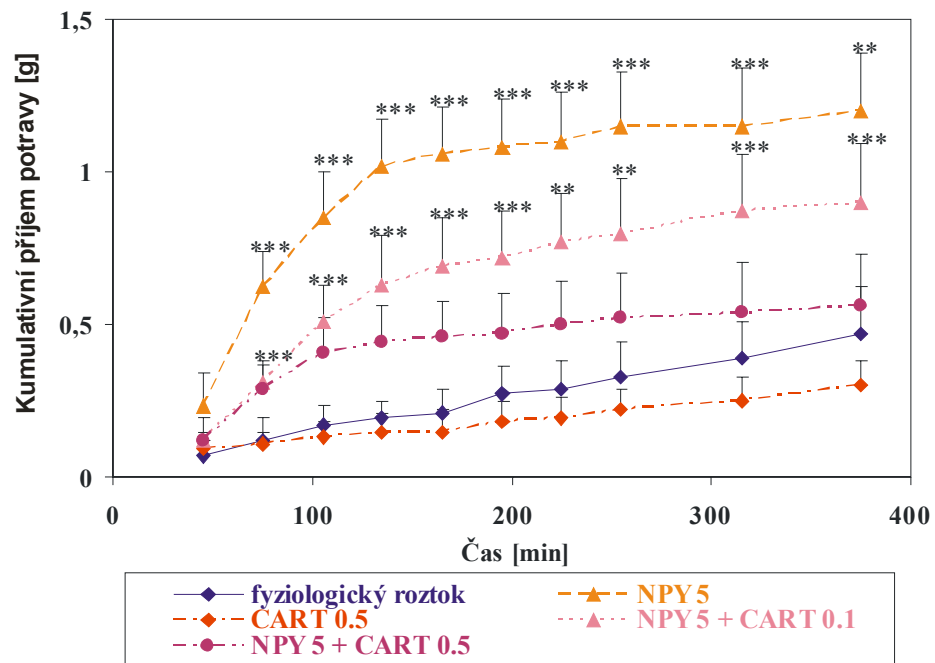
Obrázek 30. Imunohistochemie neuronů v mozku u samců kontrolních a MSG myši. Léze v oblasti nucleu arcuatu u MSG myši. Koronální části hypotalamu z MSG myši ukazují zničené neurony v ARC v porovnání s kontrolní skupinou myši. $n = 3$ myši na skupinu.

5.4.3. Účinky peptidu CART(61–102), CCK-8 a NPY na příjem potravy u sytých myších samců C57Bl/6

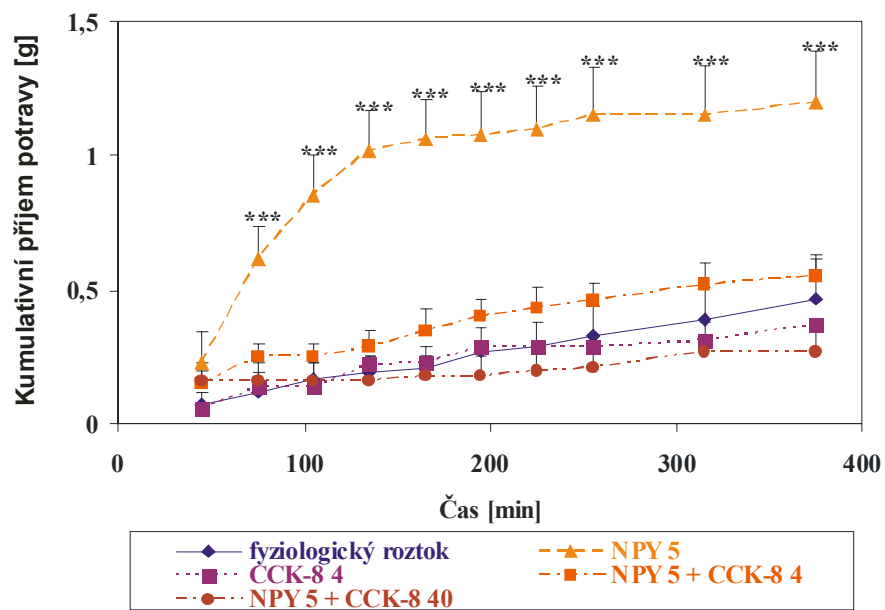
Pro objasnění vztahu peptidu CART k látkám ovlivňujících příjem potravy byl sledován příjem potravy u sytých C57Bl/6 kontrolních a MSG myší po podání peptidu CART(61–102) a NPY do třetí mozkové komory (ICV) a CCK-8 IP nebo kombinace peptidu CART(61–102) a NPY nebo kombinace NPY a CCK-8.

IP podání CCK-8 (4 a 40 µg/kg) u sytých kontrolních a MSG myší nemělo účinek na příjem potravy ve srovnání s účinkem po podání fyziologického roztoku (Obrázek 31 B, C). Peptid CART(61-102) (ICV podání, 0,5 µg/myš) u sytých kontrolních a MSG myší neměl významný účinek na příjem potravy ve srovnání s účinkem po podání fyziologického roztoku (Obrázek 31 A, C). Po podání NPY (ICV podání, 5 µg/myš) se významně zvýšil příjem potravy u sytých kontrolních a MSG myší ve srovnání s účinkem po podání fyziologického roztoku (Obrázek 31 A, B, C a 31). Kombinace NPY (ICV podání) a CCK-8 (IP podání, 45 min po ICV podání NPY) způsobila, že CCK-8 snížil příjem potravy navozený NPY u sytých kontrolních myší (Obrázek 31 B a 31 A). U MSG myší CCK-8 nesnížil příjem potravy vyvolaný pomocí NPY (Obrázek 31 C a 31 B). ICV podání peptidu CART současně s NPY způsobilo, že peptid CART(61-102) snížil příjem potravy navozený NPY u sytých kontrolních a MSG myší (Obrázek 31 A, C).

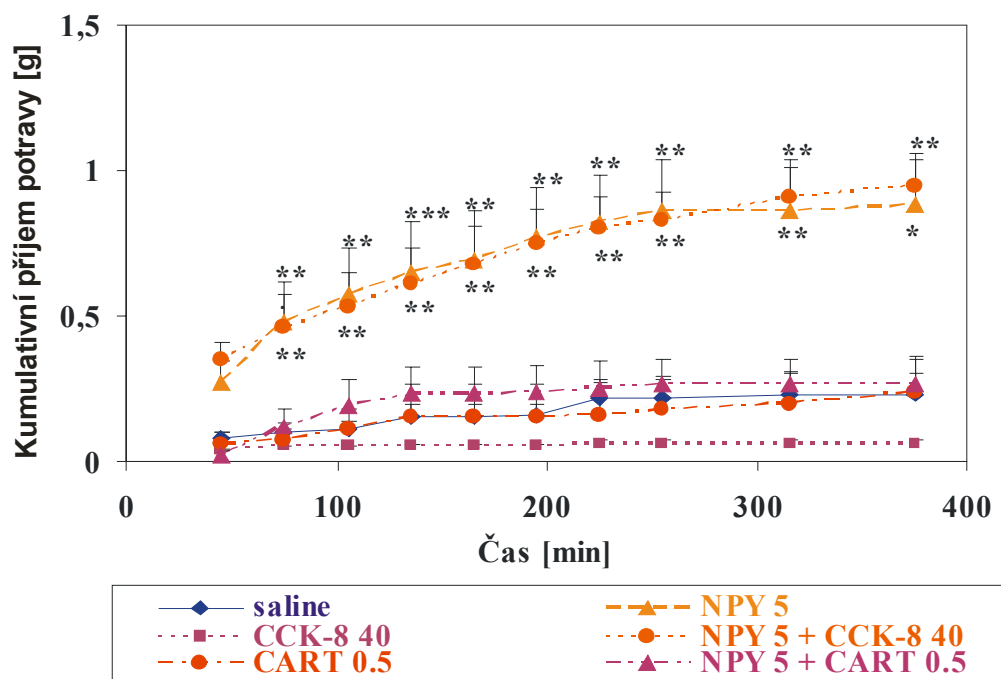
A)



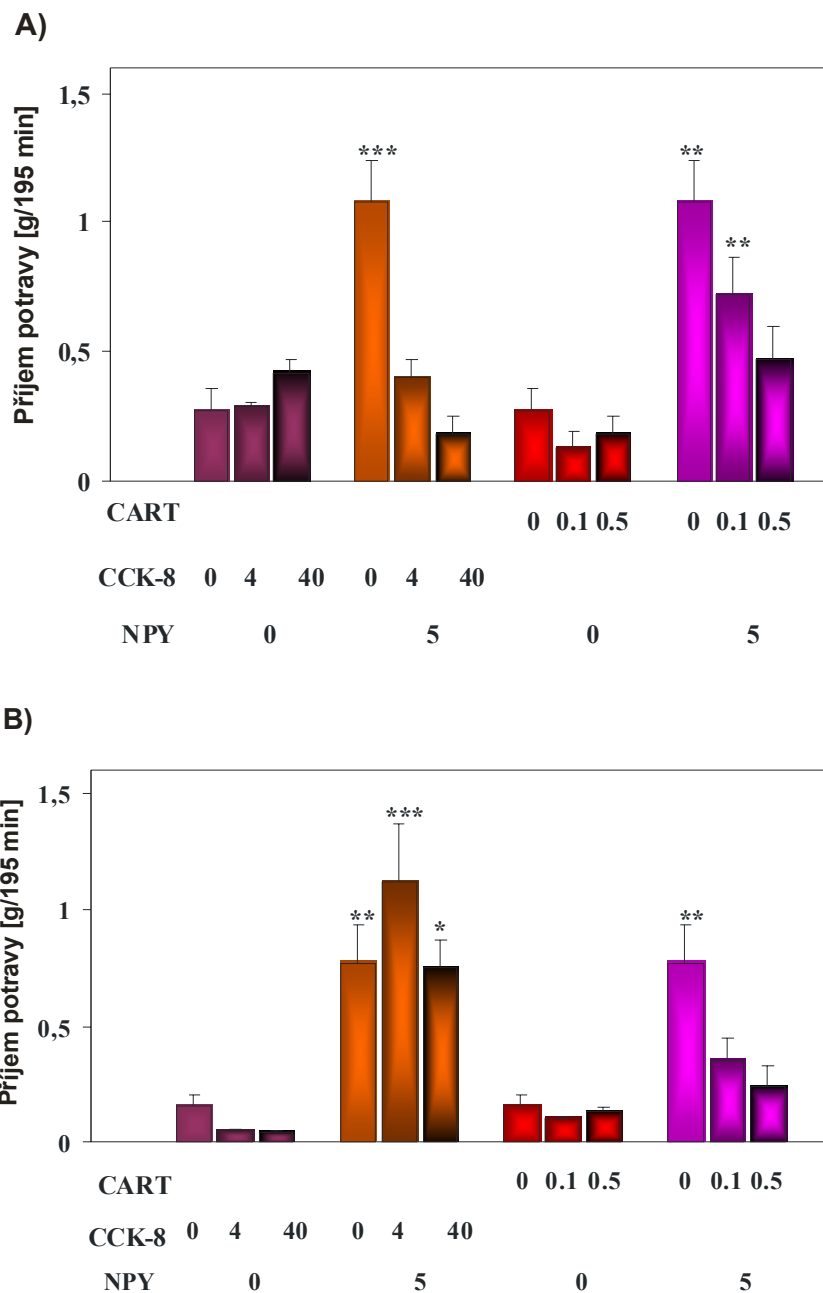
B)



C)



Obrázek 31. Kumulativní příjem potravy u sytých A,B) kontrolních myší C) MSG myší po podání NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) a NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) s CCK-8 (IP podání, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$); po NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) a NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) s CART(61-102) (ICV podání, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). $n = 6-8$ myší na skupinu. Signifikace je * $P < 0,001$ proti skupině s injikované fyziologickým roztokem (ICV podání).**



Obrázek 32. Příjem potravy u A) kontrolních a B) MSG myši 195 minut po ICV podání. Inhibice NPY (ICV podání, 5 μ g/myš), pomocí CART(61-102), (ICV podání, 0,1 a 0,5 μ g/myš) nebo CCK-8 (IP podání, 4 a 40 μ g/kg), 195 min po podání NPY. $n = 6-8$ myši na skupinu. Signifikace je * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $P < 0,001$ proti příslušné skupině injikované fyziologickým roztokem (ICV podání).**

5.5. Charakterizace účinků analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie

5.5.1. Detekce receptoru pro PrRP na hypofyzárních buněčných liniích pomocí metody Western blot.

Pro stanovení receptoru pro PrRP v hypofyzárních buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20 pomocí metody Western blot byly použity lyzáty buněk a jako pozitivní kontrola byly použity Jurkat buňky (Obrázek 33). Western blot prokázal protein v oblasti 41 kDa, tudíž všechny tři linie obsahují receptor pro PrRP.

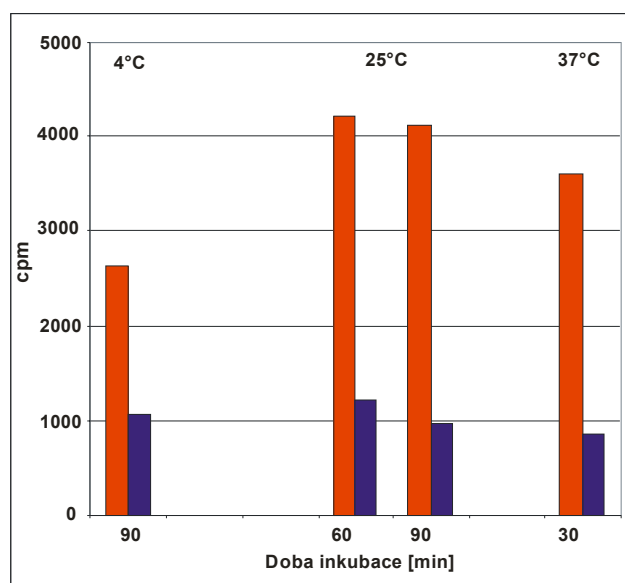


Obrázek 33. Stanovení receptoru pro PrRP na buněčných liniích AtT-20, GH3 a RC-4B / C. Receptor pro PrRP byl detekován pomocí protilátek proti receptoru GPR10. Jurkat buňky byly použity jako pozitivní kontrola.

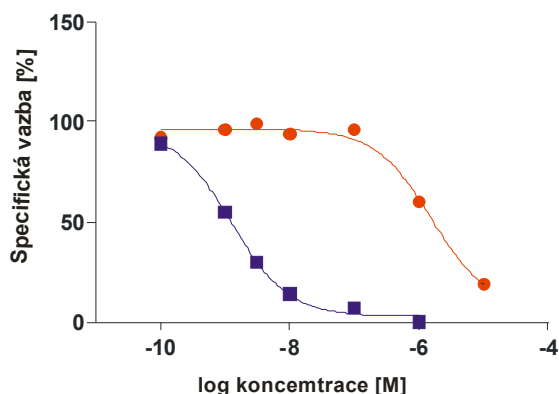
5.5.2. Optimalizace podmínek vazebných pokusů PrRP k hypofyzárním buněčným liniím

Pomocí závislosti totální a nespecifické vazby na buňkách RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly optimalizovány vazebné podmínky. Buňky na destičkách byly inkubovány při různých teplotách (4°C, 25°C a 37°C) a době inkubace (30, 60, 90, 120 či 180 minut). Bylo zjištěno, že při inkubaci při teplotě 4 °C činila nespecifická vazba více než 50 % z celkové vazby, proto tato teplota není optimální pro vazebné pokusy. Dalším krokem byla inkubace při 37 °C po dobu 30 minut, kde nespecifická vazba činila více jak 50% z celkové, což bylo nejspíše způsobeno v důsledku degradace peptidu PrRP. Závěrem bylo konstatováno, že optimální vazebné podmínky pro všechny buněčné linie jsou 25°C a doba inkubace je 60 minut, jak vyplývá z Obrázku 34 pro linii RC-4B/C. Vazba byla při 25°C stabilní v rozmezí 30-120 minut. Jako optimální počet buněk pro vazebné pokusy bylo prokázáno rozmezí 400 -500 tisíc buněk na jamku pro buňky RC-4B/C a GH3 a 300 až 400 tisíc buněk na jamku pro buněčnou

linii AtT-20. Přidání EDTA i EGTA do vazebného pufru nemělo žádný vliv na specifickou vazbu, stejně tak přidání vápenatých iontů. Přidání BPTI do vazebného pufru výrazně snížilo hodnotu EC_{50} . Vazebné křivky jsou uvedeny na Obrázku 35. Stabilita peptidu PrRP31 po inkubaci s buňkami RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byla také ověřována pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledky prokazují, že při inkubaci ve vazebném pufru bez BPTI se PrRP31 štěpí asi z 30 % na kratší fragmenty.



Obrázek 34. Grafy závislosti specifické a celkové vazby na různých dobách a teplotách inkubace na buněčné linii RC-4B/C. Vazebné pokusy probíhaly při různé teplotě (4 °C, 25 °C, 37 °C) a době inkubace (30, 60, 90minut) červená – totální vazba, modrá – nespecifická vazba.



Obrázek 35. Graf závislosti EC_{50} na přidavku BPTI do vazebného pufru u buněčné linie RC-4B/C. Červená – inkubace ve vazebném pufru bez BPTI, modrá – inkubace ve vazebném pufru s BPTI (1 mg/ml). Vazebné pokusy probíhaly 60 minut při 25 °C. Vazebný pufr o pH 7,4 obsahoval 20 mM HEPES, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl a 5 mM $MgCl_2$, 4 2 mg/ml glukózy, 1 mg/ml BSA, a buď bez přítomnosti nebo s přítomností 0,1 mg/ml BPTI.

5.5.3. Saturační vazebné experimenty

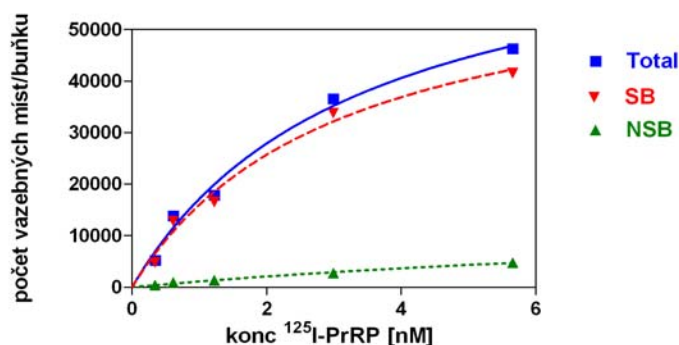
Saturační vazebné pokusy na buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly provedeny při optimalizovaných podmínkách, viz kapitola 5.5.2. U všech třech hypofyzárních buněčných linií nespecifická vazba lineárně stoupala se zvyšující se koncentrací radioligandu a nepřesáhla 50 % celkové vazby.

Saturační vazebné experimenty s ^{125}I -PrRP31 u všech třech buněčných linií prokázaly K_d v nM oblasti a B_{max} řádově v desetitisících vazebných míst/buňku. Nespecifická vazba byla u GH3 a RC nižší než 11%. Nelineární regresní analýza ukázala jedno vazebné místo, jak je znázorněno na Obrázku 36A, B. V případě buněk AtT-20 byla nespecifická vazba nižší než 22%, reprezentativní křivka je znázorněna na Obrázku 36C. V Tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty K_d a B_{max} .

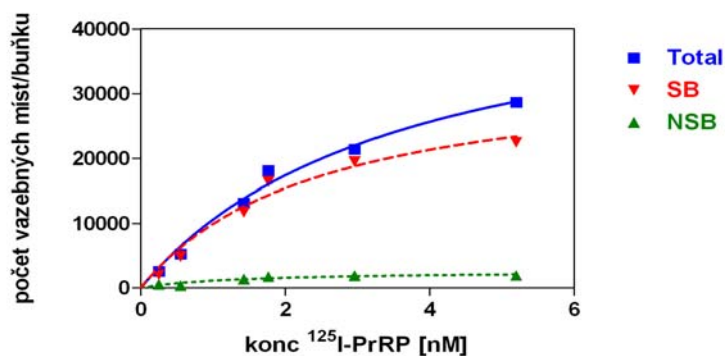
Tabulka 10. Saturační vazba ^{125}I -PrRP31 k hypofyzárním buňkám. *Obě hodnoty pro všechny buněčné linie byly zjišťovány při saturačních vazebných experimentech, probíhajících 60 minut při teplotě 25 °C, s vazebným pufrem s přidavkem 0,1 mg/ml BPTI.*

buněčná linie	B_{max} [vazebná místa/buňku]	K_d [nM]
RC-4B/C	67400 ± 14500	4,21 ± 0,66
GH3	88300 ± 12100	5,72 ± 1,08
AtT-20	22800 ± 1100	3,97 ± 1,38

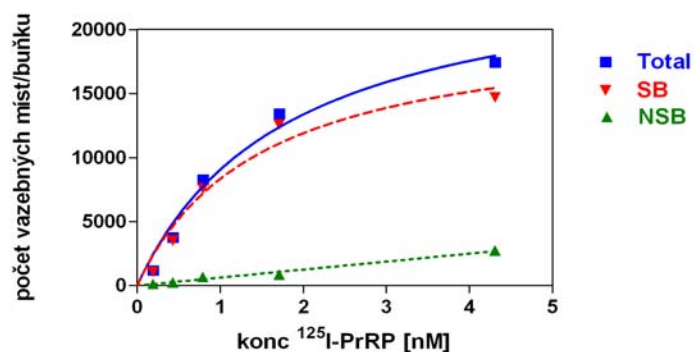
A) Buněčná linie GH3



B) Buněčná linie RC-4B/C



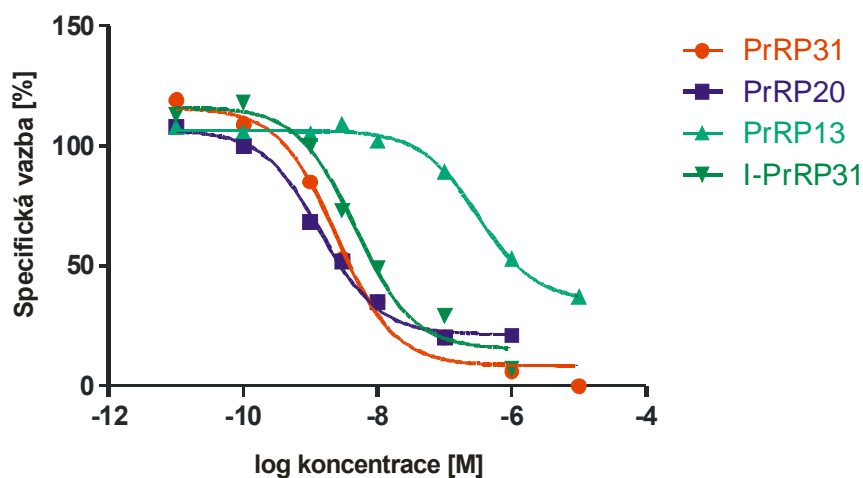
C) Buněčná linie AtT20



Obrázek 36. Reprezentativní křivky saturačních vazebných pokusů. Saturační vazebné experimenty na buněčných liniích GH3, RC-4B/C a AtT-20 probíhaly při teplotě 25 °C po dobu 60 minut, s rostoucím množstvím $^{125}\text{I-PrRP31}$ v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 10^{-5}M PrRP31 . Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové vazby a nespecifické vazby. Křivky byly vyneseny pomocí nelineární regrese.

5.5.4. Kompetitivní vazebné experimenty

Kompetitivní vazebné pokusy na buňkách RC-4B/C byly provedeny při optimálních podmínkách viz kapitola 5.5.2. Vazba ^{125}I -PrRP31 na buňky RC-4B/C byla vytěsněna analogy PrRP31, PrRP20, PrRP13 a I-PrRP31. K_i je rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu, která byla vypočítána dosazením do rovnice Chenga a Prusoffa [133] (za K_d byla dosazena hodnota 2,49 nM a koncentrace radioligandu byla 0,1 nM). Pro analogy PrRP31, PrRP20, PrRP13 a I-PrRP31 jsou hodnoty K_i uvedeny v Tabulce 11. Kompetitivní pokusy potvrzují, že PrRP31 se váže k receptoru pro PrRP se srovnatelnou afinitou jako PrRP20 a I-PrRP31 s K_i řádově 10^{-9}M . Peptid PrRP13 má nižší afinitu k receptoru pro PrRP a to s K_i řádově 10^{-7}M , jak je vidět na obrázku 37 a v Tabulce 11.



Obrázek 37. Kompetitivní vazebné křivky analogů PrRP k buněčné linii RC-4B/C.

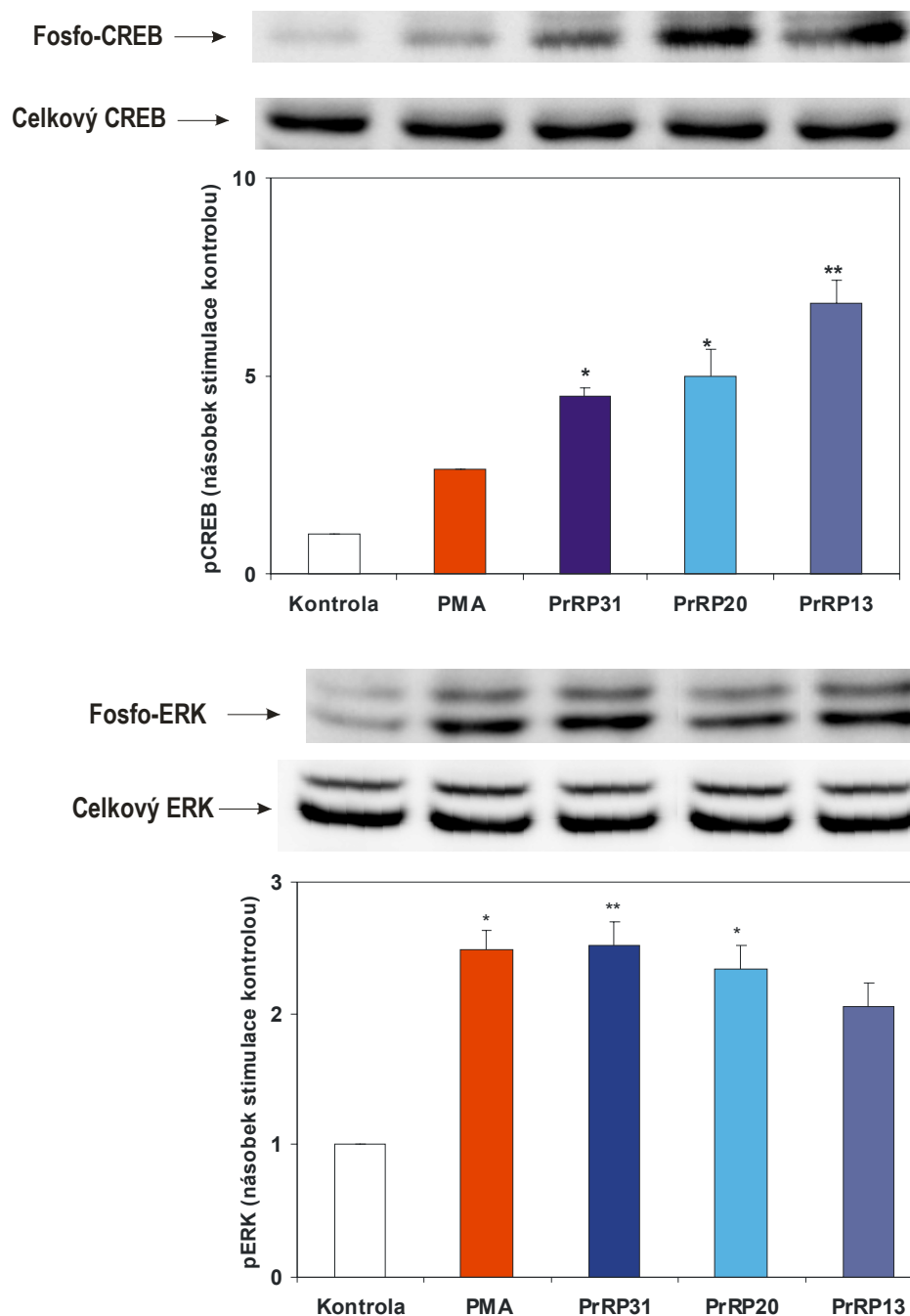
^{125}I -PrRP v koncentraci 10^{-10}M byl vytěsněn vzrůstající koncentrací analogů PrRP (60 min inkubace při 25 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-5}M PrRP31). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.

Tabulka 11. Výsledky kompetitivních vazebných experimentů pro buněčnou linii RC-4B/C. *Průměr ± S.E.M. ze tří až pěti samostatných experimentů. Kompetitivní vazebné pokusy probíhaly 60 min při 25°C. K_i bylo vypočteno z rovnice Chenga-Prusoffova (K_d bylo 4,21 nM [142]).*

Analog	K_i [M]
PrRP31	$(4,52 \pm 0,79) \times 10^{-9}$
PrRP20	$(3,20 \pm 1,24) \times 10^{-9}$
PrRP13	$(4,84 \pm 2,35) \times 10^{-7}$
I-PrRP31	$(3,66 \pm 0,49) \times 10^{-9}$

5.5.5. Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB za pomoci metody Western blot na buněčné linii RC-4B/C

Pro funkční charakterizaci účinků analogů PrRP byla zvolena metoda buněčné signalizace a detekce fosforylovaného MAPK/ERK1/2 a CREB. Buňky RC-4B/C byly pěstovány a ošetřeny, jak je popsáno v metodách, viz kapitola 4.5.2. Pro stimulaci buněk byly použity látky PMA, nebo PrRP31, PrRP20 a PrRP13. Buňky RC-4B/C byly inkubovány ke stanovení fosforylovaného MAPK/ERK1/2 a CREB se třemi látkami po dobu 5 a 30 min při 37 °C. Při inkubaci 5 min bylo pozadí mnohem nižší než při inkubaci po dobu 30 min. Na tomto základě byla zvolena inkubace 5 min a dále byla používána. PrRP31, PrRP20 a PrRP13 stimulovaly fosforylaci jak MAPK/ERK1/2, tak CREB, ovšem s různou intenzitou účinku, jak je znázorněno na Obrázku 38. Analogy PrRP31 a PrRP20 způsobily významně zvýšenou fosforylaci MAPK/ERK1/2 oproti kontrole. Účinek PrRP31 byl signifikantní v případě fosforylace CREB a nesignifikantní v případě fosforylovaného MAPK/ERK1/2 (Obrázek 38). PMA sloužil jako kontrola maximální fosforylace (odpovědi).

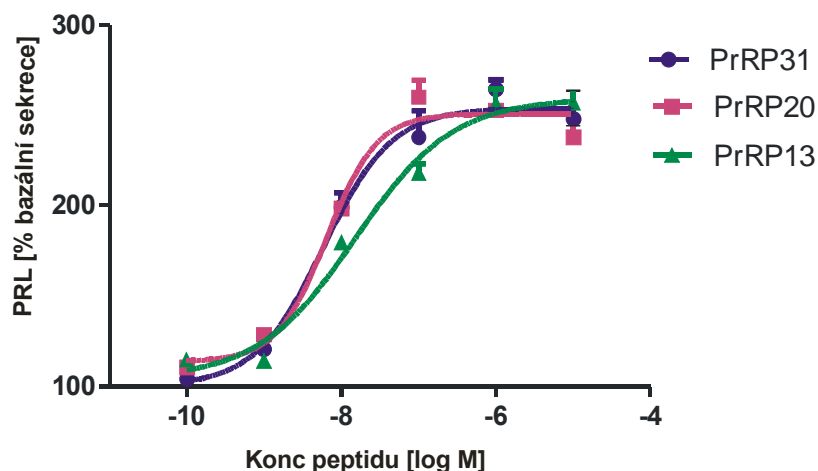


Obrázek 38. Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB účinkem analogů PrRP. Buňky RC-4B/C byly stimulovány PMA a analogy PrRP v koncentraci 10^{-5} M po dobu 5 min při 37 °C. Lyzace buněk a metoda Western blot probíhala, jak je popsáno v metodách v kapitole 4.5.2. a 4.6. Data jsou průměr \pm S.E.M. $n = 3$ pokusy. Úroveň fosforylace kontroly buněk byla stanovena jako 1. Signifikace je * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve srovnání s kontrolou.

5.5.6. Stanovení uvolňování hypofyzárních hormonů z buněčných linií

Jako další funkční test s analogy PrRP bylo stanoveno uvolňování hormonů hypofýzy do media na buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20. Nejdříve byla testována schopnost analogů PrRP působit na uvolňování hormonů do media pomocí potkaního hypofyzárního kitu MILLIPLEX (na bázi ELISA). Buněčné linie RC-4B/C a GH3 byly ponechány v mediu bez séra 2 hodiny a buněčná linie AtT-20 byla ponechána v mediu bez séra přes noc. Buňky byly inkubovány s PrRP31 a standardy (TRH pro GH3 buňky, CRH pro AtT-20 buňky) po dobu 1-3 hodin při teplotě 37°C. Poté byl sebrán supernatant, ve kterém byly stanoveny hypofyzární hormony. Médium buněčné linie GH3 bylo testováno na přítomnost GH a PRL, linie AtT-20 uvolňuje hormon ACTH a linie RC-4B/C všechny hormony předního laloku hypofýzy. Bylo zjištěno, že z buněčné linie RC-4B/C byl vylučován PRL po 1 a 3 hodinách působení PrRP.

Proto byla dále použita linie RC-4B/C ke stanovení uvolňování PRL po působení PrRP31, PrRP20 a PrRP13, jak je znázorněno na Obrázku 39. Hodnoty EC_{50} pro PrRP31 byly $(5,90 \pm 1,43) \times 10^{-9}$ M a PrRP20 $(6,52 \pm 1,10) \times 10^{-9}$ M a PrRP13 $(1,51 \pm 1,35) \times 10^{-8}$ M.



Obrázek 39. Produkce PRL po působení analogů PrRP na buněčnou linii RC-4B/C. Na buňky RC-4B/C bylo působeno PrRP31, PrRP20 a PrRP13 po dobu 1 hodiny. V supernatantu, tj. v mediu byla změřena koncentrace PRL pomocí RIA metody. Zobrazené výsledky jsou v procentech \pm S.E.M. proti kontrole (100%). $n = 3$ (nezávislé pokusy prováděné v duplikátech). Bazální hladina PRL byla 2,9 ng/ml.

6. DISKUZE

6.1. Význam nově objevených neuropeptidů

Energetická rovnováha organismu (vztah energetického příjmu a výdeje) je složitý děj regulovaný celou řadou metabolických procesů, kterých se účastní jak složky příjmu potravy (jako glukosa, proteiny, lipidy), tak látky vylučované v periférii (gastrointestinálním traktu) anebo centrální nervové soustavě, které spolu navzájem interagují. V CNS je za oblast odpovídající za regulaci příjmu potravy považován hypotalamus, který je řídicím centrem a zprostředkovává ostatní podněty z CNS i periferie. Těchto procesů se účastní mnoho neuropřenašečů a hormonů, jejichž významnou část tvoří hormony peptidové. V posledních 15 letech bylo objeveno velké množství nových peptidů regulujících příjem potravy, které mnohdy působí paralelně vedle sebe a jejichž přesná funkce v organismu není dosud plně objasněna [143, 144].

K centrálně působícím neuropeptidům patří také peptid CART, jehož receptor dosud není znám, a PrRP, jehož hlavní funkce v organismu je stále nejasná. Oba anorexigenní neuropeptidy jsou hojně sekretovány v hypotalamu na podněty související jak s krátkodobou, tak s dlouhodobou regulací energetického metabolismu (jejich exprese a sekrece je regulována např. leptinem).

Tato práce se zabývá účinky těchto dvou peptidů a jejich fragmentů jak *in vitro* na buněčných liniích obsahujících (potenciální) receptor, tak, v případě peptidu CART a jeho fragmentů, *in vivo* u myší. Snaha nalézt minimální biologicky aktivní fragment těchto látek a metodiku k testování těchto analogů by mohla v budoucnu vést k vývoji nových selektivně účinných a dlouhodobě působících analogů, potenciálních antiobezitních látek.

Vzhledem k tomu, že role těchto neuropeptidů v regulaci příjmu potravy, stejně jako jejich vztah k ostatním látkám ovlivňujícím příjem potravy není přesně známa, byl také zkoumán vzájemný vztah peptidu CART, anorexigenního CCK-8 a orexigenního NPY jak u štíhlých, tak u obézních MSG myší. Objasnění základních mechanismů regulace příjmu potravy může v budoucnu také přispět k léčbě obezity a chorob s ní spojených.

6.2. Strukturně-aktivitní studie fragmentů peptidu CART

Ačkoliv bylo od doby objevu peptidu CART věnováno velké úsilí tomu, aby byl identifikován jeho receptor(y) [1, 86], dosud bylo publikováno pouze několik prací popisujících vazbu peptidu CART k buněčným liniím a receptor pro peptid CART je stále neznámý. Specifická vazba ^{125}I -CART(61-102) k myším hypofyzárním buňkám AtT-20 byla publikována Vicentic a kol. [87] a k potkaním feochromocytomálním buňkám PC12 naší skupinou [89]. Jiné peptidy jako např. CCK-8, αMSH , TRH, angiotensin II, neurotensin a leptin nebyly schopny vytěsnit vazbu ^{125}I -CART(61-102) k buňkám PC12 nebo membránám z nich i v koncentraci 10^{-5}M [89].

Byla také testována signalizace v buňkách PC12 po stimulaci peptidem CART(61-102). Pomocí metody Western blot byla stanovena fosforylace MAPK/ERK1/2, CREB a Akt. Jako pozitivní kontrola sloužil NGF. Na rozdíl od práce Lakatos a kol. [84], kteří našli zvýšenou fosforylaci ERK po působení CART(55-102) v hypofyzárních buňkách AtT-20, v naší studii nebyla zvýšená fosforylace v buňkách PC12 po působení CART(61-102) (Obrázek 24) ačkoli NGF zvyšovalo v souladu s literaturou fosforylaci jak MAPK/ERK1/2, tak Akt a CREB signifikantně ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Vazebné studie s fragmenty peptidu CART jsou velmi vhodné pro porovnání afinity různých částí molekuly a k hledání minimální biologicky aktivní struktury peptidu CART. Naše práce [134] představuje první podrobnou strukturně-aktivitní studii zahrnující několik farmakologických testů za srovnatelných experimentálních podmínek. Byla zde vybrána série fragmentů peptidu CART, které postupně zahrnují části struktury CART(61-102), a testována jejich vazebná afinita k buňkám PC12. Peptidy, které ukázaly významnou afinitu k buňkám PC12, byly pak testovány z hlediska vlivu na příjem potravy.

Většina *in vivo* studií s peptidy CART popisuje přirozeně se vyskytující peptidy CART(55-102) a CART(61-102) se zaměřením na příjem potravy po centrálním podání látek [92] [52, 145]. Thim a kol. [2] byli první, kdo publikovali studii s několika analogy peptidu CART: CART(54-102), CART(55-102), CART(61-102) a CART(62-102). Analogy byly podávány ICV hladovým myším a způsobily snížení příjmu potravy v závislosti na dávce a se srovnatelným efektem, ačkoliv CART(55-102) byl o něco účinnější než ostatní peptidy [2]. Další rozsáhlá studie srovnávala účinky ICV podaných CART(55-102) a CART(62-102)

hladovým myším a ukázala, že CART(62-102) pětkrát účinněji než CART(55-102) snižoval příjem potravy při stejné injikované dávce [75].

V naší studii snižoval ICV podaný CART(61-102) významně příjem potravy u hladových myší, a to v závislosti na dávce, jak jsme již publikovali dříve [89]. ICV podání (0.1 nmol/myš) jak CART(55-102), tak CART(61-102) snížilo příjem potravy ve srovnatelném rozsahu a tyto hodnoty byly signifikantní ve srovnání s příjmem potravy kontrolních myší injikovaných fyziologickým roztokem ($P < 0.001$) (Obrázek 23).

CART(61-102) byl jodován s použitím radioaktivního a stabilního izotopu. Pomocí HPLC byly izolovány 4 píky odpovídající mono- a di-jodovaným peptidem s nemodifikovaným nebo oxidovaným Met⁶⁷ (methionin sulfoxid). Hmotnostní spektrometrie potvrdila, že v průběhu jodace dochází k částečné oxidaci Met⁶⁷. Kompetitivní vazebný experiment ukázal, že tyto čtyři peptidy měly stejnou vazebnou afinitu k buňkám PC12 (naše nepublikované výsledky). Tento poznatek je v souladu s našimi předchozími výsledky, které dokázaly, že jodace CART(61-102) nezměnila vazebnou afinitu peptidu k buňkám PC12 [89]. Dijodovaný CART(61-102) se vázal k buňkám PC12 a jejich membránám s afinitou stejnou jako CART(61-102), také jsme potvrdili částečné uchování anorexigenní aktivity di-jodovaného CART(61-102) [89]. V této studii byly všechny vazebné experimenty prováděny s monojodovaným ¹²⁵I-CART(61-102), který tvořil hlavní frakci při jodaci CART(61-102).

N-terminální peptid 1 a peptidy 2-5 (Tabulka 6), které odpovídají sekvenci aminokyselin mezi cysteiny v CART(61-102), mají Cys nahrazeny glycinem (nebo Ala v pozici 101). Tyto peptidy se nevázaly k buňkám PC12 ani jejich membránám v rozmezí testovaných koncentrací (Tabulka 6).

Peptidy 6 a 7 jsou cyklické analogy peptidu 3, oba obsahují Cys na N- a C-konci (Tabulka 6). Ačkoliv se liší pouze v C-koncové funkční skupině, chovaly se velmi rozdílně. Zatímco látka 7 se skupinou COOH na C-konci nevytěsnila vazbu ¹²⁵I-CART(61-102) na buňky PC12, látka 6 s amidem na C-konci se vázala k nediferencovaným buňkám a jejich membránám s K_i řádově 10^{-4} M (Tabulka 7). Afinita peptidu 6 k diferencovaným buňkám byla 7krát nižší ve srovnání s nediferencovanými. Možným vysvětlením je, že po diferenciaci na neurony se může prostředí vazebného místa změnit a tím se změnit i vazba ¹²⁵I-CART(61-

102) k těmto buňkám. Receptor pro peptid CART však ještě nebyl identifikován, takže není možné popsat další detaily vazby.

Látky 9 a 10 jsou prodlouženou verzí látky 6, liší se jen pozicí jejich disulfidických můstků (pozice 68-86 nebo 74-86) (Tabulka 6). Jejich vazebná afinita k nediferencovaným i diferencovaným buňkám PC12 byla srovnatelná a mírně nižší než afinita peptidu 6 (Tabulka 6). Peptid 8, který je lineární analog peptidu 9 a 10, nevykazoval žádnou vazebnou afinitu v rozmezí testovaných koncentrací. To ukazuje, že uchování kompaktní struktury s disulfidickými můstky (struktura „uzlů“) je zcela nezbytné pro biologickou aktivitu peptidu CART k potenciálnímu receptoru na buňkách PC12.

Proto také nebylo velkým překvapením, že v testu příjmu potravy fragmenty 6 a 9 nesnižovaly příjem potravy u hladových myší po ICV podání až do koncentrace 4 nmol/myš, tj. 40krát vyšší dávky než jaká byla použita u CART(55-102) a CART(61-102) (Obrázek 23). Dávka, kterou jsme použili u fragmentů peptidu CART, byla zároveň nejvyšší dávka, která byla použita v předchozích studiích [138, 139]. V případě peptidů 6 a 9 nemůžeme také zcela vyloučit možný antagonistický, tj. orexigenní efekt. Couceyro a Fritz [146] ukázali, že CART(55-102) bez disulfidických můstků zvyšoval příjem potravy u sytých potkanů. Nicméně v našem testu jsme žádný signifikantní vzrůst příjmu potravy nepozorovali.

Lineární fragment 11 a jeho derivát 12 (Tabulka 6) byly odvozeny od fragmentu CART(62-76), jehož biologická aktivita byla publikována již dříve [138, 139]. Podle této studie peptidy CART(55-76) a (62-76) snižovaly po ICV podání příjem potravy u potkanů. Nebylo ale popsáno, zda se SH skupiny peptidů během pokusu oxidují nebo nikoliv. V naší studii měl fragment 11 volné cysteiny, fragment 12 měl cysteiny v pozici 68 a 74 chráněné skupinou AcM. Linearita tohoto fragmentu byla potvrzena hmotnostní spektrometrií [134]. Žádný z těchto dvou fragmentů se k nediferencovaným ani diferencovaným buňkám PC12 a membránám nevázal. Navíc nebyl peptid 11 ani schopen inhibovat příjem potravy po ICV podání hladovým myším. Rozpor mezi našimi a výsledky dříve publikovanými Lambertem a kol. [138] a Kaskem a kol. [139] je možno vysvětlit různými druhy použitých zvířat (myši *versus* potkani) a experimentálního uspořádání (hladová nebo volně žeroucí zvířata). Na druhé straně naše výsledky testu příjmu potravy jsou v souladu s výsledky naší vazebné studie.

C-koncové fragmenty 13 a 14 (Tabulka 6) byly syntetizovány, abychom ověřili studii provedenou Dylagem a kol. v r. 1996 [92, 147]. V této studii byla popsána biologická aktivita

derivátů CART(55-102) s redukovanými thiolovými skupinami v lineární a cyklické formě: [Abu^{86,94}]CART(85-102) a [Abu^{86, 88, 94, 101}]CART(85-102). Oba lineární analogy peptidu CART byly schopny inhibovat pohybovou aktivitu vyvolanou po centrálním podání kokainu a amfetaminu myším [147]. Je také známo, že CART(55-102) snižuje pohybovou aktivitu zvýšenou po podání kokainu [148] nebo amfetaminu [149] do oblasti nucleu accumbens potkanů. Srovnání těchto studií navzájem je ovšem obtížné, protože byly použity rozdílné zvířecí modely i podání do odlišných oblastí mozku.

V naší práci jsme resyntetizovali [Abu^{86,94}]CART(85-102) jako lineární peptid 13 a jeho cyklický derivát 14 (Tabulka 6). Linearita peptidu 13 byla kontrolována v průběhu vazebného experimentu, protože tento peptid je velmi náchylný ke spontánní oxidaci. Skutečně bylo nalezeno asi 20% oxidované formy po 30 min inkubace peptidu s buňkami PC12. Výsledky ukazují, že se oba fragmenty 13 a 14 nevázaly k buňkám PC12 v rozmezí testovaných koncentrací (Tabulka 7). Navíc peptid 13 nevykázal žádnou biologickou aktivitu v testu příjmu potravy v dávce 4 nmol/myš po ICV podání (Obrázek 23). V práci Dylaga a kol. [92, 147] byla naznačena důležitost C-koncové části peptidu CART pro interakci s opioidním systémem. Naše studie však ukazuje, že pro uchování anorexigenní aktivity peptidu CART(61-102) je nezbytná struktura obsahující disulfidické můstky a jeho C-koncová část snížení příjmu potravy nezpůsobuje.

Výsledky naší studie tedy ukazují, že pro uchování vysoké vazebné afinity k buňkám PC12, stejně jako pro anorexigenní aktivitu jsou zásadně důležité disulfidické můstky ve struktuře „uzlu“ peptidu CART. Z výsledku měření týkajících se N-koncových fragmentů, které tvořily vnější smyčku, se dá usuzovat, že biologická aktivita peptidů CART je do jisté míry spojena s N-koncovou smyčkou molekuly spíše než s C-koncovou.

Vzhledem k tomu, že peptid CART se hojně vyskytuje jak v CNS, tak v periférii, je možno předpokládat jeho mnohočetné role v organismu. To může také znamenat, že existuje více typů receptorů pro peptid CART, a tak i vazebná místa s různou afinitou pro fragmenty peptidu CART. Vazba ke specifickým tumorovým buňkám obsahujícím vysoké množství vazebných míst pro peptid CART, stejně jako použití fragmentů peptidu CART tak může pomoci identifikovat receptory peptidu CART a objasnit fyziologickou úlohu peptidu CART v organismu.

6.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u štíhlých myší

Hypotéza naší studie o možném synergistickém účinku peptidu CART a CCK-8 je založena na již dříve zjištěném synergistickém účinku leptinu a CCK v regulaci příjmu potravy [48] a faktu, že peptid CART je v nervu vagu kolokalizován s receptory CCK₁ [77]. Vycházeli jsme tudíž z předpokladu, že peptid CART a CCK mohou být v rámci vlivu na příjem potravy součástí neurochemického propojení mezi hypothalamem (ARC) a mozkovým kmenem (NTS). Potenciální spolupráce mezi centrálním peptidem CART a periferním CCK-8 byla sledována v testu krátkodobého příjmu potravy u štíhlých hladových myší a pomocí aktivace c-Fos ve třech oblastech mozku důležitých pro regulaci příjmu potravy: PVN, DMH a NTS [150]. Navíc byly sledovány parametry doplňující chování při příjmu potravy – pohybová aktivita a analgeze. Látky byly podávány jednotlivě nebo simultánně, peptid CART centrálně do třetí mozkové komory (zde je nejvýraznější účinek na příjem potravy [151]), CCK-8 intraperitoneálně (periferní podání vyvolává také největší účinek [152]).

Intracerebroventrikulární podání CART(61-102) hladovým myším C57Bl/6 (Obrázek 25) způsobilo snížení příjmu potravy v závislosti na dávce podobně jako ve studiích Thima a kol. [2], Bannona a kol. [75] a Vrang a kol. [74]. CCK-8 v dávkách 0.4 a 4 µg/kg nevykazoval žádný signifikantní efekt na příjem potravy u hladových myší kmene C57Bl/6 (EC₅₀ byla v tomto uspořádání experimentu 15 µg/kg, jak jsme určili v předběžné studii), zatímco outbrední myši NMRI byly citlivé k dávce CCK-8 4 µg/kg (s EC₅₀ přibližně 9 µg/kg [89]). Hladina leptinu v séru myší po 17h hladovění byla u robustních myší kmene NMRI asi o 50% vyšší než u subtilních myší C57Bl/6 (0,45 ng/ml u NMRI myší [89] a 0,30 ng/ml u samců C57Bl/6 (naše nepublikovaná data)). To bylo patrně hlavním důvodem, proč prahová dávka CCK-8 pro účinek na příjem potravy byla vyšší u myší C57Bl/6 ve srovnání s kmenem NMRI (4 *versus* 0,4 µg/kg).

Při hladovění dlouhém 48 hodin byl účinek CCK-8 potlačen v důsledku snížených hladin leptinu [51]. Barrachina a kol. [48] popsali synergistický účinek leptinu a CCK u myší, které hladověly 24h. V našem experimentu tedy můžeme předpokládat, že společný účinek leptinu a CCK byl zachován u myší hladovějících 17h, ačkoliv hladiny leptinu byly po hladovění sniženy.

V této studii jsme prokázali, že nízké dávky CCK prohloubily anorexigenní účinek peptidu CART v závislosti na dávce a prodloužily významně dobu účinku peptidu CART na příjem potravy (Obrázek 25,26). To je v souladu s naší hypotézou týkající se synergistického účinku CART(61-102) a CCK-8 na příjem potravy. Dále jsme dokázali významný vliv receptoru CCK₁ v tomto procesu. Selektivní antagonist receptoru CCK₁ devazepid [153] totiž blokoval účinek CART(61-102) na příjem potravy (Obrázek 25, 26B). Podobným způsobem byl anorexigenní účinek peptidu CART inhibován antagonistou receptoru pro GLP-1 [154]. Naopak selektivní antagonist receptoru CCK₂, který neovlivňuje příjem potravy [153], nezměnil pokles v příjmu potravy navozený peptidem CART. To podpořilo teorii o účasti výlučně receptoru CCK₁ v tomto ději.

Simultánní podání leptinu a CCK-8 v dávce 3.5 µg/kg IP, která byla podprahová, navozovalo sytost a aktivovalo neurony v mozkovém kmeni u štíhlých samců C57Bl/6, stejně jako zvyšovalo počet neuronů pozitivních na Fos v oblasti PVN [48]. V naší studii byla imunoreaktivita proteinu Fos po injekci peptidu CART a/nebo CCK-8 detekována v oblastech NTS, PVN a DMH (Obrázek 27), což jsou známe oblasti, kde působí peptid CART [74, 155] i CCK [51, 140, 156] [48, 157]. Byl zaznamenán vysoký vzrůst počtu buněk pozitivních na Fos při dávkách peptidu CART, které signifikantně snižovaly příjem potravy, podávaných s podprahovou dávkou CCK-8 (Obrázek 27). Tato neuronální odpověď byla signifikantně silnější než odpověď jednotlivě podaných peptidů. Tento výsledek podpořil ideu kooperace mezi peptidem CART a CCK-8 jak v mozkovém kmeni, tak v hypothalamických oblastech PVN a DMH, kde jsou zpracovávány signály jak z periferie, tak z nucleu arcuatu. PVN je vysoce inervovaný a propojený s DMH. Bylo publikováno, že CCK může aktivovat neurony produkující CRH v DMH [140] pomocí noradrenergní projekce z NTS [158]. Tuto studii doplňuje naše nejnovější publikace [159], která popisuje zvýšení proteinu Fos v ARC a snížení proteinu Fos v orexinových neuronech LHA po společném podání CART peptidu a CCK.

Předchozí data byla navíc doplněna o behaviorální testy, které s příjmem potravy souvisí. Již dříve byl popsán vliv peptidu CART na lokomoční (pohybovou) aktivitu ve volném poli a na analgesii [75, 139]. Velikost účinku se ale lišila u různých studií. V naší studii také testy lokomoční aktivity sledovaly trend popsáný u příjmu potravy (Obrázek 28A). Dávka CCK-8, která nesnížila signifikantně příjem potravy (4 µg/kg IP), neměla vliv ani na test volného pole (lokomoční aktivitu), zatímco CART(61-102) v dávce 0.5 µg/myš a

kombinace CCK-8 a CART(61-102) signifikantně potlačovala lokomoční aktivitu myší v porovnání s myši injikovanými fyziologickým roztokem. Podobně jako v testu příjmu potravy, i zde devazepid samotný neovlivnil lokomoční aktivitu myší, ale blokoval účinek peptidu CART (Obrázek 28A). Toto zjištění opět ukazuje, že účinek peptidu CART byl prohloubený pomocí aktivace receptoru CCK₁ a ukazuje na sedativní účinky látek související s pocitem sytosti. Analgetický test horké plotny, který byl také prováděn, pak neukázal žádnou signifikantní změnu po podání výše jmenovaných látek jednotlivě i v kombinaci (Obrázek 28B).

Dlouhotrvající synergistický účinek CCK a peptidu CART může být interpretován také s poukázáním na výsledky de Lartigue a kol. [78], které popisují expresi CART indukovanou CCK a následný účinek endogenně produkovaného peptidu CART. Na druhé straně Broberger a kol. uvádějí, že exprese receptoru CCK₁ nezávisí na metabolickém stavu organismu [77]. Naše výsledky byly potvrzeny v letos vyšlé publikaci autorů de Lartigue a kol. [160] zabývající se synergistickým účinkem CCK a peptidu CART na aktivitu neuronů v nervu vagu a na příjem potravy.

Nervová osa mezi oblastmi ARC-PVN-DVC (dorsální komplex nervu vagu, jehož součástí je NTS) má patrně integrační roli při synergistickém vlivu leptinu a CCK na snížení příjmu potravy [48]. Příjem potravy byl ovlivněn podáním leptinu a CCK a trval více než 7 hodin. Aktivace nervových cest pro leptin a CCK se překrývá ve třech jádrech: PVN, parabrachiálním jádru a NTS [51]. Z naší studie vyplývá, že peptid CART spolu s CCK může fungovat jako mediátor anorexigenního účinku v hypothalamu i mozgovém kmeni. Dalšímu poznávání mechanismu účinku peptidu CART a jiných peptidů by značně pomohla identifikace receptoru pro peptid CART, popřípadě nalezení antagonisty peptidu CART.

6.4. Anorektický účinek peptidu CART a CCK-8 v modelu štíhlých a obézních MSG myší

Obezita způsobená účinky glutamátu sodného v prvních dnech života hlodavců (MSG obezita) vede ke specifickým lézím v nucleu arcuatu [115], ale ostatní hypotalamická jádra zůstávají nedotčená [120, 121]. Metabolické a fyzické změny spojené s lézemi v ARC u MSG myší ukazují na zásadní roli, kterou ARC v regulaci energetické i hormonální regulace organismu hraje. V ARC u MSG hlodavců je nefunkční signalizace jak leptinu, tak inzulínu [121] [161] a produkce anorexigenního peptidu CART i orexigenního NPY je inhibována [77, 119]. Jak NPY, tak peptid CART jsou produkovány také v jiných hypotalamických oblastech, jako je PVN a LHA. Imunoreaktivita NPY zůstala u MSG myší zachována v PVN [119], pravděpodobně v důsledku lokální exprese NPY [162]. CART je exprimován vedle ARC také v mozgovém kmeni a nervu vagu [77]. To vše dokazuje, že existují zdroje NPY a peptidu CART vně ARC, které při obezitě vyvolané MSG zůstávají zachovány.

Hlodavci po působení MSG nerozlišují příjem potravy za světla a tmy, protože mají degradované buňky oční sítnice [120, 163] a dochází u nich k vývoji obezity a akumulace tuku [164], který je spíše důsledkem menšího energetického výdeje než zvýšeného příjmu potravy [165]. Možným důvodem je snížený účinek anorexigenních peptidů, které mají místo účinku nebo jsou zároveň i produkovány v ARC. Po 24h hladovění vykazovaly MSG obézní myši kmene NMRI stále snížený příjem potravy ve srovnání s kontrolami, a tudíž bylo velmi obtížné sledovat odpověď jak na periferně injikovaný CCK-8 [121], tak na centrálně podaný peptid CART (naše předběžné výsledky).

K překonání problému, jak měřit krátkodobý příjem potravy u MSG myší, jsme použili následující poznatky:

- 1/ u štíhlých sytých myší bylo dokázáno, že jak CCK, tak peptid CART snižuje orexigenní účinek centrálně podaného NPY [52, 138].
- 2/ u MSG potkanů byl zachován orexigenní účinek NPY [166].

V naší studii [167] byl sledován příjem potravy u volně žeroucích samců myší C57Bl/6 jak štíhlých, tak MSG obézních, po paralelním centrálním podání orexigenního NPY buď s peptidem CART(61-102), nebo s periferně podaným CCK-8. Cílem práce bylo najít, zda anorexigenní peptid CART a CCK mají uchovanou biologickou funkci u myší s MSG

obezitou a obecně, zda funkční ARC je nezbytný pro anorexigenní účinek CCK a peptidu CART.

NPY vykazuje účinek na příjem potravy na úrovni PVN a LHA, které jsou bohatě inervovány z ARC a kde jsou exprimovány receptory Y1 [16]. Naše studie ukázala, že ačkoliv u MSG myši byly prakticky všechny nervové dráhy z ARC přerušeny, orexigenní účinek NPY a anorexigenní účinek peptidu CART po podání látek do třetí mozkové komory zůstaly zachovány (Obrázek 31C). Exogenní peptid CART snížil orexigenní účinek NPY pravděpodobně působením na specifická vazebná místa peptidu CART [89], která jsou umístěna vně ARC. Je možné, že u MSG myši může NPY a peptid CART signalizovat přes PVN a LHA, kde jsou intaktní neuronální dráhy.

Anorexigenní účinek CCK je navozen přes receptory CCK₁ lokalizované jak v CNS, tak v periférii. CCK se účastní regulace sytosti a hladu ve dvou oblastech mozku: v NTS v mozkovém kmeni a v mediobazálním hypotalamu [50]. Ačkoliv žádná z těchto oblastí nebyla glutamátem sodným poškozena, CCK-8, který u kontrolních myši snižoval účinek NPY, nebyl schopen u MSG myši orexigenní účinek NPY ovlivnit (Obrázek 31C). To je v souladu s naší předchozí studií s MSG myšmi kmene NMRI [121]. Již dříve bylo dokázáno, že MSG obézní hlodavci mají potlačenou odezvu na periferně i centrálně podaný leptin [168] [161] podobně jako u obézních Koletsky *fa^k/fa^k* potkanů [169, 170] nebo *db/db* myši [170, 171]. Hlavním důvodem ve všech těchto případech je nefunkční nebo chybějící leptinový receptor. Zároveň všechny tyto zvířecí modely s nefunkční signalizací leptinu nebyly schopny reagovat na CCK [121]. U obézních Koletsky potkanů byla obnovena signalizace leptinu v ARC použitím injekce lidského lepr^b adenoviru do ARC, a tím byl také aktivován účinek CCK v mozkovém kmeni, kde jsou procesovány sytostní impulzy z periferie [171]. To ukazuje, že funkční leptinové receptory v ARC jsou zcela nezbytné pro to, aby byla navozena sytosti pomocí CCK. Zároveň to také vysvětluje, proč nebyl CCK funkční u MSG myši v naší studii. Zdá se tedy, že zatímco pro účinek peptidu CART na příjem potravy nejsou nezbytné funkční receptory pro leptin v ARC, odpověď periferního CCK je na nich přímo závislá.

6.5. Charakterizace účinku analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie

Peptid uvolňující prolaktin, jehož název byl odvozen z jeho předpokládané funkce, je nyní považován za látku s odlišnou úlohou v organizmu, jako je např. sekrece hormonů a regulace příjmu a výdeje energie. Protože dosud není znám žádný antagonist PrRP, který by pomohl objasnit přesnou fyziologickou funkci tohoto peptidu, a zároveň je velmi málo poznatků týkajících se vazby analogů PrRP k receptoru [114] [113], rozhodli jsme se provést vazebnou a funkční studii analogů PrRP s buňkami, které spontánně exprimují receptor pro PrRP a jsou tudíž velmi vhodným materiálem [142]

Vazbu a funkční vlastnosti dvou přirozeně se vyskytujících analogů PrRP- PrRP31 a PrRP20, stejně jako C-koncového fragmentu PrRP13 jsme sledovali u tří hypofyzárních buněčných linií: myších adenokortikotropů AtT-20, potkaních buněk GH3 obsahujících somatotropy a laktotropy a potkaních buněk RC-4B/C obsahujících somatotropy, laktotropy, adenokortikotropy a gonadotropy. U všech tří linií byla dokázána přítomnost receptoru pro PrRP pomocí imunodetekce metodou western blotu (Obrázek 33).

Specifická vazba ^{125}I -PrRP31 byla charakterizována v buňkách s transfektovaným GPR10 [93] [113] nebo UHR-1 [93, 99] a byla nalezena K_d v pM a nM oblasti. Potkaní membrány z hypotalamu a hypofýzy vykazovaly specifickou vazbu ^{125}I -PrRP31 s K_d v nM oblasti [172]. V naší studii byly nalezeny ve všech hypofyzárních liniích K_d v nM oblasti, což je obvyklé pro vazbu endogenního ligandu k receptoru [132]. Všechny tři buněčné linie vykazovaly poměrně vysoký – ale možný [132] počet vazebných míst na buňku (B_{\max}) – řádově v desetitisících. Buňky tedy jsou vhodné pro následné vazebné a funkční studie.

Vazebná afinita všech tří analogů, PrRP31, 20 a 13, byla porovnávána v kompetitivním vazebném experimentu na buňkách RC-4B/C. PrRP31 a 20 měly podobnou K_i v oblasti nM, srovnatelnou s publikovanými údaji [113]. PrRP13 měl ale K_i o dva řády vyšší, tedy vazebnou afinitu k receptoru slabší (Tabulka 11). Vazebná afinita I-PrRP31 byla srovnatelná s afinitou PrRP31, takže jodace peptidu nezměnila vlastnosti PrRP (Tabulka 11).

PrRP byl původně považován za látku, která vyvolává sekreci prolaktinu jak v potkaních buňkách RC-4B/C, tak v primárních hypofyzárních buňkách laktujících potkaních samic [93]. Později bylo však zjištěno, že tento efekt je slabší než účinek jiných hormonů jako TRH nebo vasoaktivního intestinálního peptidu [173, 174]. Dokonce bylo popsáno, že PrRP

pouze zvýšil produkci PRL vyvolanou TRH [175], ale neovlivnil přímo sekreci PRL v primárních potkaních hypofyzárních buňkách [176] nebo *in vivo* [177]. Takže bylo zpochybněno, že vliv na sekreci PRL je primární úloha PrRP v organismu [178]. Na druhé straně bylo zjištěno, že PrRP vyvolává sekreci růstového hormonu, ale ne PRL v lidských hypofyzárních adenomech [173]. U potkanů způsobily centrální injekce PrRP uvolňování GH, LH a ACTH [179, 180]. V důsledku rozporupných výsledků předchozích studií jsme se rozhodli testovat vliv PrRP31 na sekreci všech hypofyzárních hormonů z příslušných tří buněčných linií. Bylo použito ELISA testu MILLIPLEX pro potkaní hypofyzární hormony. Ze všech tří použitých linií jsme pozorovali velmi silnou sekreci PRL jen u linie RC-4B/C tak, jak bylo původně popsáno v práci Hinumy a kol. [93].

Tuto linii jsme dále použili k podrobnějšímu testování sekrece PRL a bylo zjištěno, že PrRP31 i 20 i 13 uvolňují PRL dávkově závisle se srovnatelnou EC_{50} v nM oblasti (Obrázek 39).

Neurotransmitery, které se účastní regulace energetického metabolismu a působí na receptory spřažené s G-proteinem, jako je i PrRP, obvykle aktivují MAPK/ERK1/2 a následně genovou transkripci navozenou aktivací CREB [181]. Bylo popsáno, že PrRP stimuluje fosforylaci jak MAPK/ERK1/2 [108], tak CREB [182] v buňkách GH3, a tak ovlivňuje zvýšení aktivity promotoru PRL.

V naší studii jsme zjistili, že PrRP31, 20 a 13 ekvivalentně zvyšují fosforylaci jak MAPK/ERK1/2 (v cytosolu), tak CREB (v jádře) a stimulují uvolňování PRL v buňkách RC-4B/C. To naznačuje, že jsou v této linii laktotropy aktivovány cestou signalizace MAPK/ERK1/2 a CREB. Tato buněčná linie je tudíž vhodným modelem pro testování analogů PrRP *in vitro* a PrRP20 je vhodným výchozím analogem pro další strukturně-aktivitní studie. Cílem budoucí studie by mohlo být jak nalezení antagonisty PrRP, tak agonistů PrRP se selektivně anorexigenními účinky a dlouhodobým působením.

7. SHRnutí

1/ Strukturně-aktivitní studie fragmentů reprezentujících různé části CART(61-102) charakterizovala jak jejich vazbu k feochromocytomálním buňkám PC12, tak jejich schopnost ovlivnit příjem potravy u hladových myší. Výsledky ukázaly, že pro uchování biologické aktivity peptidu CART je nezbytná kompaktní struktura obsahující disulfidické můstky. Ze všech testovaných fragmentů pouze CART(74-86) a (62-86) vykazovaly nízkou afinitu k vazebnému místu v buňkách PC12.

2/ Byl prokázán synergistický účinek CCK a peptidu CART na příjem potravy u hladových myší, který aktivoval neurony v hypothalamických oblastech PVN a DMH, stejně jako v mozgovém kmeni v NTS. Peptid CART by tak mohl působit jako mediátor anorexigenního účinku leptinu v obou těchto místech mozku.

3/ U MSG obézních myší s lézemi v ARC bylo prokázáno, že anorexigenní účinek centrálně podaného peptidu CART zůstává zachován, zatímco periferně podaný CCK u těchto myší na příjem potravy nepůsobí. Důvodem je patrně nefunkční signalizace leptinu v ARC, která je nezbytná pro zprostředkování účinku CCK na příjem potravy.

4/ Ve třech hypofyzárních buněčných liniích byla prokázána přítomnost receptoru pro PrRP a specifická vazba **PrRP** k těmto receptorům vykazovala K_d v nM oblasti. Zejména vhodná pro studium analogů PrRP se ukázala potkaní buněčná linie RC-4B/C. PrRP31 a PrRP20 měly srovnatelnou vazebnou afinitu k PrRP receptoru, PrRP13 měl afinitu řádově nižší. Nicméně všechny tři analogy stimulovaly uvolnění prolaktinu z této buněčné linie, stejně jako aktivaci MAPK/ERK1/2 a CREB v buňce.

LITERATURA

1. Rogge G, Jones D, Hubert G, Lin Y, Kuhar M: **CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions.** *Nat Rev Neurosci* 2008, **9**(10):747-758.
2. Thim L, Nielsen P, Judge M, Andersen A, Diers I, Egel-Mitani M, Hastrup S: **Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast.** *FEBS Lett* 1998, **428**(3):263-268.
3. WHO: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS09_Full.pdf.
4. Halford J: **Pharmacology of appetite suppression: implication for the treatment of obesity.** *Curr Drug Targets* 2001, **2**(4):353-370.
5. IOTF: <http://www.ietf.org/>.
6. Svačina Š: **Počet obézních Čechů stoupl za čtyři roky o 450 tisíc. To je varující, říká obezitolog.** <http://novinky.cz>, 17.8.2009
7. Han J, Lawlor D, Kimm S: **Childhood obesity.** *Lancet* 2010, **375**(9727):1737-1748.
8. Hainer V: **Obezita.** Praha: Triton; 2003.
9. Padwal R, Majumdar S: **Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant.** *Lancet* 2007, **369**(9555):71-77.
10. Strader A, Woods S: **Gastrointestinal hormones and food intake.** *Gastroenterology* 2005, **128**(1):175-191.
11. Pi-Sunyer X: **The medical risks of obesity.** *Postgrad Med* 2009, **121**(6):21-33.
12. Kopelman P: **Obesity as a medical problem.** *Nature* 2000, **404**(6778):635-643.
13. Schwartz M, Woods S, Porte DJ, Seeley R, Baskin D: **Central nervous system control of food intake.** *Nature* 2000, **404**(6778):661-671.
14. Atkinson T: **Central and peripheral neuroendocrine peptides and signalling in appetite regulation: considerations for obesity pharmacotherapy.** *Obes Rev* 2008, **9**(2):108-120.
15. Wilding J: **Neuropeptides and appetite control.** *Diabet Med* 2002, **19**(8):619-627.
16. Broberger C, Hökfelt T: **Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake.** *Physiol Behav* 2001, **74**(4-5):669-682.
17. Bouret S, Draper S, Simerly R: **Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice.** *J Neurosci* 2004, **24**(11):2797-2805.
18. Martin N, Smith K, Bloom S, Small C: **Interactions between the melanocortin system and the hypothalamo-pituitary-thyroid axis.** *Peptides* 2006, **27**(2):333-339.
19. Simpson K, Martin N, Bloom S: **Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009, **53**(2):120-128.
20. Meister B: **Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight.** *Physiol Behav* 2007, **92**(1-2):263-271.
21. Bernardis L, Bellinger L: **The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update.** *Brain Res* 1987, **434**(3):321-381.
22. Zanella M, Ribeiro Filho F: **Emerging drugs for obesity therapy.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009, **53**(2):271-280.

23. Murphy K, Dhillo W, Bloom S: **Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis.** *Endocr Rev* 2006, **27**(7):719-727.
24. M H: **Poruchy výživy a leptin.** Praha: Grada Publishing; 2002.
25. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J: **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature* 1994, **372**(6505):425-432.
26. Walder K, de Silva A: **Leptin and the treatment of obesity.** *Drug Development Research* 2000:66-79.
27. Truett G, Bahary N, Friedman J, Leibel R: **Rat obesity gene fatty (fa) maps to chromosome 5: evidence for homology with the mouse gene diabetes (db).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(17):7806-7809.
28. Porte DJ, Baskin D, Schwartz M: **Leptin and insulin action in the central nervous system.** *Nutr Rev* 2002, **60**(10 Pt 2):S20-29; discussion S68-84, 85-27.
29. Zhang F, Basinski M, Beals J, Briggs S, Churgay L, Clawson D, DiMarchi R, Furman T, Hale J, Hsiung H *et al*: **Crystal structure of the obese protein leptin-E100.** *Nature* 1997, **387**(6629):206-209.
30. Tartaglia L: **The leptin receptor.** *J Biol Chem* 1997, **272**(10):6093-6096.
31. Howard J, Cave B, Oksanen L, Tzamelis I, Bjørbaek C, Flier J: **Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3.** *Nat Med* 2004, **10**(7):734-738.
32. Harvey J, Ashford M: **Leptin in the CNS: much more than a satiety signal.** *Neuropharmacology* 2003, **44**(7):845-854.
33. Blundell T, Cutfield J, Cutfield S, Dodson E, Dodson G, Hodgkin D, Mercola D, Vijayan M: **Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals.** *Nature* 1971, **231**(5304):506-511.
34. White M, Kahn C: **The insulin signaling system.** *J Biol Chem* 1994, **269**(1):1-4.
35. Bagdade J, Bierman E, Porte DJ: **The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects.** *J Clin Invest* 1967, **46**(10):1549-1557.
36. Woods S, Seeley R, Baskin D, Schwartz M: **Insulin and the blood-brain barrier.** *Curr Pharm Des* 2003, **9**(10):795-800.
37. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K: **Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.** *Nature* 1999, **402**(6762):656-660.
38. Kojima M, Kangawa K: **Ghrelin: structure and function.** *Physiol Rev* 2005, **85**(2):495-522.
39. Sartor D, Verberne A: **Abdominal vagal signalling: a novel role for cholecystokinin in circulatory control?** *Brain Res Rev* 2008, **59**(1):140-154.
40. Moran T, Kinzig K: **Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **286**(2):G183-188.
41. Gibbs J, Young R, Smith G: **Cholecystokinin decreases food intake in rats.** *J Comp Physiol Psychol* 1973, **84**(3):488-495.
42. Moran T: **Cholecystokinin and satiety: current perspectives.** *Nutrition* 2000, **16**(10):858-865.

43. Woods S: **Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **286**(1):G7-13.
44. Little T, Horowitz M, Feinle-Bisset C: **Role of cholecystokinin in appetite control and body weight regulation.** *Obes Rev* 2005, **6**(4):297-306.
45. Smith G, Jerome C, Cushin B, Eterno R, Simansky K: **Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat.** *Science* 1981, **213**(4511):1036-1037.
46. Asin K, Bednarz L, Nikkel A, Gore PJ, Nadzan A: **A-71623, a selective CCK-A receptor agonist, suppresses food intake in the mouse, dog, and monkey.** *Pharmacol Biochem Behav* 1992, **42**(4):699-704.
47. Matson C, Reid D, Cannon T, Ritter R: **Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, **278**(4):R882-890.
48. Barrachina M, Martínez V, Wang L, Wei J, Taché Y: **Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(19):10455-10460.
49. Tatemoto K: **Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, **79**(18):5485-5489.
50. Cummings D, Overduin J: **Gastrointestinal regulation of food intake.** *J Clin Invest* 2007, **117**(1):13-23.
51. McMinn J, Sindelar D, Havel P, Schwartz M: **Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin.** *Endocrinology* 2000, **141**(12):4442-4448.
52. Kristensen P, Judge M, Thim L, Ribel U, Christjansen K, Wulff B, Clausen J, Jensen P, Madsen O, Vrang N *et al*: **Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin.** *Nature* 1998, **393**(6680):72-76.
53. Morley J, Hernandez E, Flood J: **Neuropeptide Y increases food intake in mice.** *Am J Physiol* 1987, **253**(3 Pt 2):R516-522.
54. Stephens T, Basinski M, Bristow P, Bue-Valleskey J, Burgett S, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung H, Kriauciunas A: **The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product.** *Nature* 1995, **377**(6549):530-532.
55. Spiess J, Villarreal J, Vale W: **Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus.** *Biochemistry* 1981, **20**(7):1982-1988.
56. Douglass J, McKinzie A, Couceyro P: **PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine.** *J Neurosci* 1995, **15**(3 Pt 2):2471-2481.
57. Fekete C, Lechan R: **Neuroendocrine implications for the association between cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) and hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH).** *Peptides* 2006, **27**(8):2012-2018.
58. Dun S, Brailoiu G, Yang J, Chang J, Dun N: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and sympatho-adrenal axis.** *Peptides* 2006, **27**(8):1949-1955.
59. Wierup N, Björkqvist M, Kuhar M, Mulder H, Sundler F: **CART regulates islet hormone secretion and is expressed in the beta-cells of type 2 diabetic rats.** *Diabetes* 2006, **55**(2):305-311.
60. Ekblad E: **CART in the enteric nervous system.** *Peptides* 2006, **27**(8):2024-2030.

61. Dominguez G: **The CART gene: structure and regulation.** *Peptides* 2006, **27**(8):1913-1918.
62. Stein J, Steiner D, Dey A: **Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications.** *Peptides* 2006, **27**(8):1919-1925.
63. Ludvigsen S, Thim L, Blom A, Wulff B: **Solution structure of the satiety factor, CART, reveals new functionality of a well-known fold.** *Biochemistry* 2001, **40**(31):9082-9088.
64. Murphy K, Abbott C, Mahmoudi M, Hunter R, Gardiner J, Rossi M, Stanley S, Ghatei M, Kuhar M, Bloom S: **Quantification and synthesis of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (79-102)-like immunoreactivity and mRNA in rat tissues.** *J Endocrinol* 2000, **166**(3):659-668.
65. Wierup N, Sundler F: **CART is a novel islet regulatory peptide.** *Peptides* 2006, **27**(8):2031-2036.
66. Koylu E, Couceyro P, Lambert P, Ling N, DeSouza E, Kuhar M: **Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland.** *J Neuroendocrinol* 1997, **9**(11):823-833.
67. Larsen P, Seier V, Fink-Jensen A, Holst J, Warberg J, Vrang N: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is present in hypothalamic neuroendocrine neurones and is released to the hypothalamic-pituitary portal circuit.** *J Neuroendocrinol* 2003, **15**(3):219-226.
68. Koylu E, Balkan B, Kuhar M, Pogun S: **Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response.** *Peptides* 2006, **27**(8):1956-1969.
69. Couceyro P, Paquet M, Koylu E, Kuhar M, Smith Y: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in myenteric plexus neurons of the rat ileum and co-localization with choline acetyltransferase.** *Synapse* 1998, **30**(1):1-8.
70. Wang C, Billington C, Levine A, Kotz C: **Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression.** *Neuroreport* 2000, **11**(14):3251-3255.
71. Asnicar M, Smith D, Yang D, Heiman M, Fox N, Chen Y, Hsiung H, Köster A: **Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet.** *Endocrinology* 2001, **142**(10):4394-4400.
72. Wierup N, Gunnarsdóttir A, Ekblad E, Sundler F: **Characterisation of CART-containing neurons and cells in the porcine pancreas, gastro-intestinal tract, adrenal and thyroid glands.** *BMC Neurosci* 2007, **8**:51.
73. Vrang N, Kristensen P, Tang-Christensen M, Larsen P: **Effects of leptin on arcuate pro-opiomelanocortin and cocaine-amphetamine-regulated transcript expression are independent of circulating levels of corticosterone.** *J Neuroendocrinol* 2002, **14**(11):880-886.
74. Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen P, Kristensen P: **Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour.** *Brain Res* 1999, **818**(2):499-509.
75. Bannon A, Seda J, Carmouche M, Francis J, Jarosinski M, Douglass J: **Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)**

- peptides in mice: CART 42-89 and CART 49-89 differ in potency and activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, **299**(3):1021-1026.
76. Okumura T, Yamada H, Motomura W, Kohgo Y: **Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via brain corticotropin-releasing factor system.** *Endocrinology* 2000, **141**(8):2854-2860.
 77. Broberger C, Holmberg K, Kuhar M, Hökfelt T: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(23):13506-13511.
 78. De Lartigue G, Dimaline R, Varro A, Dockray G: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin.** *J Neurosci* 2007, **27**(11):2876-2882.
 79. Jensen P, Kristensen P, Clausen J, Judge M, Hastrup S, Thim L, Wulff B, Foged C, Jensen J, Holst J *et al*: **The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans.** *FEBS Lett* 1999, **447**(2-3):139-143.
 80. Stanek L: **Cocaine- and amphetamine related transcript (CART) and anxiety.** *Peptides* 2006, **27**(8):2005-2011.
 81. Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Harvey-White J, Bannon A, Cravatt B, Kuhar M, Mackie K, Palkovits M, Kunos G: **Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide.** *Neuroendocrinology* 2005, **81**(4):273-282.
 82. Yermolaieva O, Chen J, Couceyro P, Hoshi T: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons.** *J Neurosci* 2001, **21**(19):7474-7480.
 83. Sarkar S, Wittmann G, Fekete C, Lechan R: **Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus.** *Brain Res* 2004, **999**(2):181-192.
 84. Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall R, Kuhar M: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors.** *Neurosci Lett* 2005, **384**(1-2):198-202.
 85. Yoon H, Kim S, Park H, Kim J: **Microinjection of CART peptide 55-102 into the nucleus accumbens blocks both the expression of behavioral sensitization and ERK phosphorylation by cocaine.** *Neuropharmacology* 2007, **53**(2):344-351.
 86. Vicentic A, Lakatos A, Jones D: **The CART receptors: background and recent advances.** *Peptides* 2006, **27**(8):1934-1937.
 87. Vicentic A, Lakatos A, Kuhar M: **CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells.** *Eur J Pharmacol* 2005, **528**(1-3):188-189.
 88. Keller P, Compan V, Bockaert J, Giacobino J, Charnay Y, Bouras C, Assimacopoulos-Jeannet F: **Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites.** *Peptides* 2006, **27**(6):1328-1334.

89. Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Sloncová E, Elbert T, Slaninová J, Zelezná B: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12.** *Eur J Pharmacol* 2007, **559**(2-3):109-114.
90. Jones D, Kuhar M: **CART receptor binding in primary cell cultures of the rat nucleus accumbens.** *Synapse* 2008, **62**(2):122-127.
91. Thim L, Kristensen P, Nielsen P, Wulff B, Clausen J: **Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(6):2722-2727.
92. Dylag T, Kotlinska J, Rafalski P, Pachuta A, Silberring J: **The activity of CART peptide fragments.** *Peptides* 2006, **27**(8):1926-1933.
93. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H *et al*: **A prolactin-releasing peptide in the brain.** *Nature* 1998, **393**(6682):272-276.
94. Onaka T, Takayanagi Y, Leng G: **Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide.** *Trends Endocrinol Metab* 2010, **21**(5):287-293.
95. Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, Kakihara K, Tanaka M, Hosoya M, Hinuma S: **Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain.** *Neurosci Res* 2000, **38**(3):223-230.
96. Nieminen M, Brandt A, Pietilä P, Panula P: **Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat.** *Peptides* 2000, **21**(11):1695-1701.
97. Lawrence C, Celsi F, Brennan J, Luckman S: **Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake.** *Nat Neurosci* 2000, **3**(7):645-646.
98. Kotani M, Mollereau C, Detheux M, Le Poul E, Brézillon S, Vakili J, Mazarguil H, Vassart G, Zajac J, Parmentier M: **Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides.** *Br J Pharmacol* 2001, **133**(1):138-144.
99. Langmead C, Szekeres P, Chambers J, Ratcliffe S, Jones D, Hirst W, Price G, Herdon H: **Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor.** *Br J Pharmacol* 2000, **131**(4):683-688.
100. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M, Inoue K: **Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain.** *Endocrinology* 1999, **140**(5):2326-2333.
101. Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T, Inoue K: **Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland.** *Regul Pept* 2005, **126**(1-2):97-102.
102. Sun B, Fujiwara K, Adachi S, Inoue K: **Physiological roles of prolactin-releasing peptide.** *Regul Pept* 2005, **126**(1-2):27-33.
103. Gu W, Geddes B, Zhang C, Foley K, Stricker-Krongrad A: **The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice.** *J Mol Neurosci* 2004, **22**(1-2):93-103.
104. Lawrence C, Liu Y, Stock M, Luckman S: **Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, **286**(1):R101-107.

105. Ellacott K, Lawrence C, Rothwell N, Luckman S: **PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight.** *Endocrinology* 2002, **143**(2):368-374.
106. Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G, Onaka T: **Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents.** *J Clin Invest* 2008, **118**(12):4014-4024.
107. Tóth Z, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Várnai P, Mezey E, Makara G, Palkovits M: **Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain.** *J Neurochem* 2008, **104**(3):653-666.
108. Kimura A, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Ikegami H, Hayakawa J, Hisamoto K, Morishige K, Hinuma S, Kurachi H *et al*: **Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase.** *J Biol Chem* 2000, **275**(5):3667-3674.
109. Sakamoto T, Fujimoto M, Andot M: **Fishy tales of prolactin-releasing peptide.** *Int Rev Cytol* 2003, **225**:91-130.
110. Duval D, Gutierrez-Hartmann A: **PRL-releasing peptide stimulation of PRL gene transcription--enter AKT.** *Endocrinology* 2002, **143**(1):11-12.
111. Bjursell M, Lennerås M, Göransson M, Elmgren A, Bohlooly-Y M: **GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **363**(3):633-638.
112. Bechtold D, Luckman S: **Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice.** *Endocrinology* 2006, **147**(10):4723-4729.
113. Roland B, Sutton S, Wilson S, Luo L, Pyati J, Huvar R, Erlander M, Lovenberg T: **Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery.** *Endocrinology* 1999, **140**(12):5736-5745.
114. Boyle R, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J, Travers S: **Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide.** *J Pept Sci* 2005, **11**(3):161-165.
115. Olney J: **Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.** *Science* 1969, **164**(880):719-721.
116. Chu S, Chou Y, Liu J, Chen C, Shyu J, Chou F: **Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement.** *Life Sci* 1999, **64**(24):2299-2306.
117. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer L: **High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents.** *Obesity (Silver Spring)* 2007, **15**(4):798-808.
118. Butler A, Cone R: **Knockout models resulting in the development of obesity.** *Trends Genet* 2001, **17**(10):S50-54.
119. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T: **The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(25):15043-15048.

120. Eleftheriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G: **Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass.** *Endocrinology* 2003, **144**(9):3842-3847.
121. Maletínská L, Toma R, Pirník Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M, Zelezná B: **Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice.** *Regul Pept* 2006, **136**(1-3):58-63.
122. Greene L, Tischler A: **Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, **73**(7):2424-2428.
123. Vaudry D, Stork P, Lazarovici P, Eiden L: **Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections.** *Science* 2002, **296**(5573):1648-1649.
124. Adler E, Gough N, Blundon J: **Differentiation of PC12 cells.** *Sci STKE* 2006, **2006**(351):tr9.
125. Bérault A, Noël N, Hurbain-Kosmath I, Polkowska J, Bohin A, Leiter E, Jutisz M: **[Characterization of gonadotropic cells in a new pituitary tumor cell line].** *Ann Endocrinol (Paris)* 1990, **51**(2):82-88.
126. Hurbain-Kosmath I, Bérault A, Noel N, Polkowska J, Bohin A, Jutisz M, Leiter E, Beamer W, Bedigian H, Davisson M: **Gonadotropes in a novel rat pituitary tumor cell line, RC-4B/C. Establishment and partial characterization of the cell line.** *In Vitro Cell Dev Biol* 1990, **26**(5):431-440.
127. Tashjian AJ, Yasumura Y, Levine L, Sato G, Parker M: **Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone.** *Endocrinology* 1968, **82**(2):342-352.
128. Vlotides G, Siegel E, Donangelo I, Gutman S, Ren S, Melmed S: **Rat prolactinoma cell growth regulation by epidermal growth factor receptor ligands.** *Cancer Res* 2008, **68**(15):6377-6386.
129. Jin L, Zhang S, Burguera B, Couce M, Osamura R, Kulig E, Lloyd R: **Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells.** *Endocrinology* 2000, **141**(1):333-339.
130. Czarnecki A, Vaur S, Dufy-Barbe L, Dufy B, Bresson-Bepoldin L: **Cell cycle-related changes in transient K(+) current density in the GH3 pituitary cell line.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**(6):C1819-1828.
131. Buonassisi V, SATO G, COHEN A: **Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962, **48**:1184-1190.
132. Motulsky H, Neubig R: **Analyzing radioligand binding data.** *Curr Protoc Neurosci* 2002, **Chapter 7**:Unit 7.5.
133. Chang C, Cheng Y: **Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources.** *Biochem Pharmacol* 1978, **27**(19):2297-2300.
134. Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Sanda M, Blechová M, Zelezná B, Slaninová J, Maletínská L: **Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments.** *Peptides* 2007, **28**(10):1945-1953.
135. Fraker P, Speck JJ: **Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril.** *Biochem Biophys Res Commun* 1978, **80**(4):849-857.

136. Bradford M: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
137. G: FKaP: **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** 1997.
138. Lambert P, Couceyro P, McGirr K, Dall Vechia S, Smith Y, Kuhar M: **CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y.** *Synapse* 1998, **29**(4):293-298.
139. Kask A, Schiöth H, Mutulis F, Wikberg J, Rågo L: **Anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide intensifies fear reactions in rats.** *Brain Res* 2000, **857**(1-2):283-285.
140. Kobelt P, Paulitsch S, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, van der Voort I, Tebbe J, Veh R, Klapp B, Wiedenmann B *et al*: **Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.** *Brain Res* 2006, **1117**(1):109-117.
141. Kiss A, Palkovits M, Skirboll L: **Light microscopic triple-colored immunohistochemical staining on the same vibratome section using the avidin-biotin-peroxidase complex technique.** *Histochemistry* 1988, **88**(3-6):353-356.
142. Maixnerová J, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Řezáčová M, Železná B, Maletínská L: **Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor.** submitted to Eur. J. Pharmacol. 2010.
143. Sainsbury A, Zhang L: **Role of the arcuate nucleus of the hypothalamus in regulation of body weight during energy deficit.** *Mol Cell Endocrinol* 2010, **316**(2):109-119.
144. Shioda S, Takenoya F, Yagi M, Wang L, Hori Y, Kageyama H: **Neural networks of several novel neuropeptides involved in feeding regulation.** *Nutrition* 2008, **24**(9):848-853.
145. Hunter R, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert G, Kuhar M: **CART in feeding and obesity.** *Trends Endocrinol Metab* 2004, **15**(9):454-459.
146. Couceyro P, Fritz T: **Production of recombinant CART peptides in Escherichia coli with agonist and antagonist effects on food intake in rats.** *Protein Expr Purif* 2003, **32**(2):185-193.
147. Dylag T, Rafalski P, Kotlinska J, Silberring J: **CART (85-102)-inhibition of psychostimulant-induced hyperlocomotion: importance of cyclization.** *Peptides* 2006, **27**(12):3183-3192.
148. Jaworski J, Kozel M, Philpot K, Kuhar M: **Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity.** *J Pharmacol Exp Ther* 2003, **307**(3):1038-1044.
149. Kim J, Creekmore E, Vezina P: **Microinjection of CART peptide 55-102 into the nucleus accumbens blocks amphetamine-induced locomotion.** *Neuropeptides* 2003, **37**(6):369-373.
150. Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Pirník Z, Kiss A, Zelezná B: **Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice.** *BMC Neurosci* 2008, **9**:101.

151. Kuhar M, Adams L, Hunter R, Vechia S, Smith Y: **CART peptides.** *Regul Pept* 2000, **89**(1-3):1-6.
152. Hirose Y, Inui A, Teranishi A, Miura M, Nakajima M, Okita M, Nakajima Y, Himori N, Baba S, Kasuga M: **Cholecystokinin octapeptide analogues suppress food intake via central CCK-A receptors in mice.** *Am J Physiol* 1993, **265**(3 Pt 2):R481-486.
153. Moran T, Ameglio P, Schwartz G, McHugh P: **Blockade of type A, not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK.** *Am J Physiol* 1992, **262**(1 Pt 2):R46-50.
154. Aja S, Ewing C, Lin J, Hyun J, Moran T: **Blockade of central GLP-1 receptors prevents CART-induced hypophagia and brain c-Fos expression.** *Peptides* 2006, **27**(1):157-164.
155. Zheng H, Patterson L, Berthoud H: **CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake.** *Brain Res* 2002, **957**(2):298-310.
156. Kobelt P, Tebbe J, Tjandra I, Stengel A, Bae H, Andresen V, van der Voort I, Veh R, Werner C, Klapp B *et al*: **CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **288**(3):R751-758.
157. Mönnikes H, Lauer G, Arnold R: **Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat.** *Brain Res* 1997, **770**(1-2):277-288.
158. Sawchenko P, Swanson L: **The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat.** *Brain Res* 1982, **257**(3):275-325.
159. Pirnik Z, Maixnerová J, Matysková R, Koutová D, Zelezná B, Maletínská L, Kiss A: **Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation.** *Peptides* 2010, **31**(1):139-144.
160. De Lartigue G, Dimaline R, Varro A, Raybould H, de la Serre CB, Dockray GJ: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript mediates the actions of cholecystokinin on rat vagal afferent neurons.** *Gastroenterology* 2010, **138** (4): 1479-90.
161. Dawson R, Pelleymounter M, Millard W, Liu S, Eppler B: **Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage.** *Am J Physiol* 1997, **273**(1 Pt 1):E202-206.
162. Kerkérian L, Pelletier G: **Effects of monosodium L-glutamate administration on neuropeptide Y-containing neurons in the rat hypothalamus.** *Brain Res* 1986, **369**(1-2):388-390.
163. Mistlberger R, Antle M: **Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat.** *Brain Res* 1999, **842**(1):73-83.
164. Djazayeri A, Miller D, Stock M: **Energy balances in obese mice.** *Nutr Metab* 1979, **23**(5):357-367.

165. Morris M, Tortelli C, Filippis A, Proietto J: **Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat.** *Regul Pept* 1998, **75-76**:441-447.
166. Tang-Christensen M, Kristensen P, Stidsen C, Brand C, Larsen P: **Central administration of Y5 receptor antisense decreases spontaneous food intake and attenuates feeding in response to exogenous neuropeptide Y.** *J Endocrinol* 1998, **159**(2):307-312.
167. Zelezná B, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Blokesová D, Maletínská L: **Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice.** *Physiol Res* 2009, **58**(5):717-723.
168. Tang-Christensen M, Havel P, Jacobs R, Larsen P, Cameron J: **Central administration of leptin inhibits food intake and activates the sympathetic nervous system in rhesus macaques.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**(2):711-717.
169. Takaya K, Ogawa Y, Hiraoka J, Hosoda K, Yamori Y, Nakao K, Koletsky R: **Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat.** *Nat Genet* 1996, **14**(2):130-131.
170. Morton G, Niswender K, Rhodes C, Myers MJ, Blevins J, Baskin D, Schwartz M: **Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats.** *Endocrinology* 2003, **144**(5):2016-2024.
171. Morton G, Blevins J, Williams D, Niswender K, Gelling R, Rhodes C, Baskin D, Schwartz M: **Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals.** *J Clin Invest* 2005, **115**(3):703-710.
172. Satoh F, Smith D, Gardiner J, Mahmoodi M, Murphy K, Ghatei M, Bloom S: **Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding sites in the rat--evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle.** *Br J Pharmacol* 2000, **129**(8):1787-1793.
173. Rubinek T, Hadani M, Barkai G, Melmed S, Shimon I: **Prolactin (PRL)-releasing peptide stimulates PRL secretion from human fetal pituitary cultures and growth hormone release from cultured pituitary adenomas.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(6):2826-2830.
174. Watanobe H, Schiöth H, Wikberg J, Suda T: **Evaluation of the role for prolactin-releasing peptide in prolactin secretion induced by ether stress and suckling in the rat: comparison with vasoactive intestinal peptide.** *Brain Res* 2000, **865**(1):91-96.
175. Spuch C, Diz-Chaves Y, Pérez-Tilve D, Alvarez-Crespo M, Mallo F: **Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo.** *Endocrine* 2007, **31**(2):119-124.
176. Samson W, Resch Z, Murphy T, Chang J: **Gender-biased activity of the novel prolactin releasing peptides: comparison with thyrotropin releasing hormone reveals only pharmacologic effects.** *Endocrine* 1998, **9**(3):289-291.
177. Jarry H, Heuer H, Schomburg L, Bauer K: **Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo.** *Neuroendocrinology* 2000, **71**(4):262-267.
178. Taylor M, Samson W: **The prolactin releasing peptides: RF-amide peptides.** *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**(9):1206-1215.
179. Iijima N, Matsumoto Y, Yano T, Tanaka M, Yamamoto T, Kakihara K, Kataoka Y, Tamada Y, Matsumoto H, Suzuki N *et al*: **A novel function of prolactin-releasing**

- peptide in the control of growth hormone via secretion of somatostatin from the hypothalamus.** *Endocrinology* 2001, **142**(7):3239-3243.
180. Seal L, Small C, Kim M, Stanley S, Taheri S, Ghatei M, Bloom S: **Prolactin releasing peptide (PrRP) stimulates luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) via a hypothalamic mechanism in male rats.** *Endocrinology* 2000, **141**(5):1909-1912.
181. Berthoud H, Sutton G, Townsend R, Patterson L, Zheng H: **Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size.** *Physiol Behav* 2006, **89**(4):517-524.
182. Hayakawa J, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y, Hisamoto K, Mabuchi S, Hinuma S, Murata Y: **Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein.** *Endocrinology* 2002, **143**(1):13-22.

PŘÍLOHA

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace týkající se tématu disertační práce (s IF):

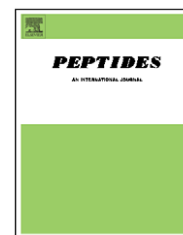
1. Maletínská, L., **Maixnerová, J.**, Matyšková, R., Haugvicová, R., Šloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J., Železná, B.: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur. J. Pharmacol.* 559, 109 – 114, (2007). **IF = 2,585 (2009)**
2. **Maixnerová J.**, Hlaváček J, Blokešová D, Kowalczyk W, Elbert T, Šanda M, Blechová M, Železná B, Slaninová J, Maletínská L. Structure – activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 28, 1945-1953, (2007). **IF = 2,705 (2009)**
3. Maletínská L., **Maixnerová J.**, Matyšková R., Haugvicová R., Pirnik Z., Kiss A., Železná B.: Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci.* 9(1), 101-110, (2008). **IF = 2,744 (2009)**
4. Železná B., **Maixnerová J.**, Matyšková R., Haugvicová R., Blokešová D., Maletínská L.: Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. *Phys. Res.* 58(5), 717-23, (2009). **IF = 1,430 (2009)**
5. Pirnik Z, **Maixnerová J.**, Matyšková R, Koutová D, Železná B, Maletínská L, Kiss A. Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation. *Peptides* 31(1), 139-44, 2010. **IF = 2,705 (2009)**
6. **Maixnerová J.**, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Řezáčová M, Železná B, Maletínská L. Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor. Submitted to *Eur. J. Pharmacol.* (červenec 2010).

Publikace týkající se tématu disertační práce (bez IF):

1. Matyšková, R., **Maixnerová, J.**, Maletínská, L.: Epidemie obezity a regulace příjmu potravy. *Vesmír* 87, 410, 2008/6.

Publikace týkající se jiných témat (s IF):

1. Matyšková, R., Maletínská, L., **Maixnerová, J.**, Pirník, Z., Kiss, A., Železná, L.: Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57Bl/6 and NMRI mice. *Phys. Res.* 57, 727-734, (2008). **IF = 1,430 (2009)**
2. Matyšková R, Železná B, **Maixnerová J**, Koutová D, Haluzík M, Maletínská L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Horm Metab Res.* 42(3), 182-6, 2010. **IF = 2,686 (2009)**

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Structure–activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments

Jana Maixnerová^a, Jan Hlaváček^a, Darja Blokešová^a, Wioleta Kowalczyk^b,
Tomáš Elbert^a, Miloslav Šanda^a, Miroslava Blechová^a, Blanka Železná^a,
Jiřina Slaninová^a, Lenka Maletínská^{a,*}

^a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

^b Faculty of Chemistry, University of Gdansk, Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdansk 6, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2007

Received in revised form

20 July 2007

Accepted 20 July 2007

Published on line 27 July 2007

Keywords:

CART peptide

Fragments

Binding

PC12 cells

Food intake

Mice

ABSTRACT

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides are neuropeptides abundant in the central nervous system and periphery found to be involved in the regulation of food intake behavior and other physiological processes. Recently, we reported specific binding of ¹²⁵I-CART(61–102) to the rat adrenal pheochromocytoma cell line PC12, both intact cells and cell membranes. In this study, several fragments of CART(61–102) corresponding to its structural loops were synthesized and tested for their potency in binding experiments using PC12 intact cells and cell membranes and in feeding test with fasted mice. From all shorter peptides tested, only CART(74–86) and CART(62–86) containing disulfide bridges kept partial binding potency of the original molecule with K_i in 10^{-5} and 10^{-4} M range. However, these fragments were not able to inhibit food intake after their central administration up to a dose of 4 nmol/mouse. The results showed that a compact structure containing three disulfide bridges is necessary for preservation of full biological activity of CART peptides.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides were discovered by Douglass et al. [6,7] and since that they have been found to be expressed in specific parts of the central nervous system such as hypothalamus and pituitary [4,20], as well as in periphery (in adrenal medulla [8], islets of Langerhans [16,32], or gut [11]). CART peptides are involved in

the regulation of feeding and energy expenditure, reward and reinforcement processes, stress, endocrine regulation, and sympathetic nerve-regulated activities (for reviews, see [2,14] and the entire issue of Peptides [19]).

ProCART of rat and mouse is identical, consists of 102 amino acids and is processed to two main biologically active CART peptides, i.e. to CART(55–102) and CART(61–102), containing three disulfide bonds between cysteines in positions

* Corresponding author. Tel.: +420 220183525; fax: +420 220183571.

E-mail address: maletin@uochb.cas.cz (L. Maletínská).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; Abu, 2-aminobutyric acid; Acn, acetamidomethyl; AP, anterior-posterior; CART, cocaine- and amphetamine-regulated transcript; DCC, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; DCM, dichloromethane; DIC, N,N'-diisopropylcarbodiimide; DMF, dimethylformamide; DVB, divinylbenzene; EDT, ethanedithiol; HOBt, N-hydroxybenzotriazole; i.c.v., intracerebroventricular; i.p., intraperitoneal; MBHA, methylbenzhydrylamine; NGF, nerve growth factor; NMP, N-methylpyrrolidinone; TBTU, 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate; TEA, triethylamine; TFA, trifluoroacetic acid; TIS, triisopropylsilane; V, ventricular. 0196-9781/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2007.07.022

68 and 86, 74 and 94, and 88 and 101 [29]. Reduction of the disulfide bridges not only deteriorated anorexigenic effect of the peptide, but also changed its character into an orexigenic one [5]. As determined by NMR spectroscopy, CART(55–102) contains a compact core stabilized by disulfide bonds and disordered N-terminus [25].

The central nervous system contains both CART(55–102) and (62–102) peptides, whose biological activity differs in specific tests [1,9,29]. In the periphery, longer CART peptides, namely CART(1–89) and (10–89), were isolated from adrenal glands [29].

Peptides of the pro-part of CART(1–102) are considered biologically inactive. CART(1–27) failed to attenuate food intake in freely fed rats [24], activate cell signaling [23] and displace ^{125}I -CART(61–102) binding to mouse pituitary cell line AtT20 [31].

N-terminal fragments of CART(55–102), i.e. CART(55–76) and (62–76) were found active in feeding and behavioral tests in rats [17,24]. C-terminal peptide CART(85–102) was also synthesized and its ability to attenuate sensitization to morphine-induced hyperlocomotion was reported [9,10].

Despite enormous effort, no receptors for CART have been isolated and cloned to date. Specific binding of ^{125}I -CART(61–102) to the AtT20 tumor cell line has been reported [30,31]. Besides, binding of a fusion protein consisting of CART(55–102) and green fluorescent protein to dissociated hypothalamic cells and HepG2 cells was described by Keller et al. [18]. Recently, we have reported specific binding of ^{125}I -CART(61–102) to PC12 cells, both non-differentiated and differentiated into a neuronal phenotype [26].

PC12 is single cell clonal line from rat adrenal pheochromocytoma which responds reversibly to nerve growth factor (NGF). By exposure to NGF, the PC12 cells cease to multiply and begin to extend branching processes similar to those produced by sympathetic neurons in primary cell culture [13]. The findings from our previous studies point to a possible role of CART in the sympatho-adreno-medullar system [8].

In this study, we present synthesis of several new peptide fragments corresponding to structural loops of CART(61–102). We report their binding to PC12 cells both non-differentiated and differentiated. The anorexigenic effect of selected fragments after intracerebroventricular (i.c.v.) administration in fasted mice was also determined.

Previously studied peptides CART(62–76) [17] and C-terminal [$\text{Abu}^{86,94}$]CART(85–102) [10] were also resynthesized in order to evaluate their binding to PC12 cells and their anorexigenic activity under our experimental conditions.

2. Materials and methods

2.1. Peptides

Peptides CART(61–102) and (55–102) were obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Structures of their shortened analogs 1–14 are described in Table 1. Peptides 2, 4, 5 and 7 were synthesized at the University of Gdansk, Poland. Peptides 1, 3, 6 and 8–14 were synthesized in the Institute of

Table 1 – Structure of CART peptide fragments

CART (55–102)	55 VPIYEKKY	61 GQVPM	68 CDAGEQC	74 CAVRK	86 GARIGKLC	88 DCPRGT	94 SCNSFLLK	101 KCL
CART (61–102)		KYQVPM	CDAGEQC	CAVRK	GARIGKLC	DCPRGT	SCNSFLLK	KCL
1		YGQVPM -NH ₂						
2			GDAGEQG -NH ₂					
3				GAVRK	GARIGKLG -NH ₂			
4						GPRGTSG -NH ₂		
5							GNSFLLKAL -OH	
6				CAVRK	GARIGKLC -NH ₂			
7				CAVRK	GARIGKLC -OH			
8		YGQVPM	CDAGEQC(Acm)	AVRK	GARIGKLC -NH ₂			
9		YGQVPM	CDAGEQC(Amc)	AVRK	GARIGKLC -NH ₂			
10		YGQVPM	C(Acm)	DAGEQC	AVRK	GARIGKLC -NH ₂		
11		YGQVPM	CDAGEQCAV					
12		YGQVPM	C(Acm)	DAGQ	C(Acm)	AV -OH		
13			LAbu	DCPRGTSA	bu	NSFLLKCL -OH		
14			LAbu	DCPRGTSA	bu	NSFLLKCL -OH		

Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, Academy of Sciences of the Czech Republic.

2.1.1. Synthesis of peptides 2, 4, 5 and 7

The peptides were synthesized manually by the solid-phase method, by stepwise coupling of Boc-amino acids to the growing peptide chain on MBHA resin (Senn Chemicals AG, 1% DVB, 200–400 mesh, 0.67 mmol/g) or on Boc-Cys(MeOBzl)-Merrifield Resin (GL Biochem Ltd. (Shanghai) 1% DVB, 100–180 mesh, 0.7 mmol/g). Fully protected peptide resins were synthesized according to standard procedures involving (i) deprotection steps using 33% TFA in the presence of anisole (1%), 5 and 25 min; (ii) neutralization with 10% TEA/DCM, 3 and 7 min and (iii) couplings mediated by the DCC/HOBt or TBTU/HOBt reagents. On completion of the syntheses, the protected peptide resins were treated with liquid HF in the presence of anisole at 0 °C and free peptides oxidized with I₂ in methanol. The crude products were desalted on a Sephadex G-15 column and eluted with aqueous acetic acid (30%) at a flow rate of 3 ml/h. After freeze-drying, the fractions comprising the major peak were purified by preparative RP-HPLC using a Waters instrument (Milford, MA, USA).

2.1.2. Synthesis of peptides 1, 3, 6 and 8–14

The peptide sequences were assembled either in a solid-phase synthesizer ALADIN II (Development Workshops, IOCB, Prague, Czech Republic, peptides 1, 3, 6, and 10–12) or ABI433A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, peptides 8, 9, 13, and 14) by stepwise coupling of the corresponding Fmoc-amino acids to the growing chain on Rink amide resin (1% DVB, 200–400 mesh, 0.65 mmol/g) or on Wang resin (1% DVB, 100–200 mesh, 0.82 mmol/g), both from IRIS, Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany. Fully protected peptide resins were synthesized according to a standard procedure involving (i)

cleavage of the N^α-Fmoc protecting group with 20% piperidine in DMF, (ii) coupling, mediated by mixtures of coupling reagents DIC/HOBt in DMF or TBTU/HOBt in NMP. On completion of syntheses, the deprotection and detachment of linear peptides from the resins were carried out simultaneously, using a TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:2) cleaving mixture. Each of the resins was washed with a TFA/H₂O (96:4) mixture and the combined TFA filtrates were evaporated at room temperature. The precipitated residues were triturated with cold *tert*-butyl-methylether, collected by suction and dried in vacuum at 30 °C. The linear peptides were purified by HPLC using a Spectra Physics instrument with SP 8800 pump, SP4290 integrator and Thermo Separation Products Spectra 100 UV detector. The disulfide bonds were closed by oxidation with pure oxygen in 0.1 M pyridine-acetate buffer (pH 6.8). The resulting peptides were purified by HPLC using a Spectra Physics instrument (San Jose, CA, USA).

The purity and identity of all peptides was determined by analytical HPLC, amino acid analysis, and by the FAB MS technique (Micromass, Manchester, UK) (Table 2).

2.2. Iodination of CART(61–102)

CART(61–102) was iodinated at Tyr⁶² either with Na ¹²⁵I (MP Biomedicals, Illkirch, France) or non-radioactive NaI (Sigma, St. Louis, MO, USA) using Iodo-Gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) [12] in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.15 M NaCl for 15 min at room temperature according to manufacturer's instructions. Both radioactive and non-radioactive iodinations were performed under identical conditions (i.e. 5 equiv. of the peptide were used for 1 equiv. of non-radioactive NaI or Na ¹²⁵I). Non-, mono- and di-iodinated CART(61–102) were separated by RP-HPLC using an Luna 3 μ phenyl-hexyl 150 mm × 4.6 mm column (Phenom-

Table 2 – Analytical data of CART peptide fragments

Peptide	Formula ^a	MW/(M + 1) ⁺	HPLC ^b RT
1 CART(62–67)-NH ₂	C ₃₁ H ₄₈ N ₈ O ₈ S	692.8/693.2	10.94 ^g
2 [Gly ^{68,74}]CART(68–74)-NH ₂	C ₂₃ H ₃₆ N ₁₂ O ₉	631.6/632.3	10.58 ^c
3 [Gly ^{74,86}]CART(74–86)-NH ₂	C ₅₅ H ₁₀₄ N ₂₂ O ₁₃	1281.6/1281.8	9.91 ^d
4 [Gly ^{88,94}]CART(88–94)-NH ₂	C ₂₄ H ₄₄ N ₁₁ O ₉	629.7/630.3	10.50 ^e
5 [Gly ⁹⁴ , Ala ¹⁰¹]CART(94–102)-OH	C ₄₅ H ₇₅ N ₁₁ O ₁₂	962.2/962.8	15.62 ^f
6 CART(74–86)-NH ₂ (S–S, 74–86)	C ₅₇ H ₁₀₆ N ₂₂ O ₁₃ S ₂	1371.8/1371.7	19.02 ^g
7 CART(74–86)-OH(S–S, 74–86)	C ₅₇ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₁₄ S ₂	1372.7/1372.8	8.00 ^h
8 [Cys(Acm) ⁷⁴ , Cys(H) ^{68,86}]CART(62–86)-NH ₂	C ₁₁₃ H ₁₉₁ N ₃₇ O ₃₀ S ₄	2724.3/2723.3	20.52 ⁱ
9 [Cys(Acm) ⁷⁴]CART(62–86)-NH ₂ (S–S, 68–86)	C ₁₁₃ H ₁₈₉ N ₃₇ O ₃₃ S ₄	2722.3/2721.3	20.05 ⁱ
10 [Cys(Acm) ⁶⁸]CART(62–86)-NH ₂ (S–S, 74–86)	C ₁₁₃ H ₁₈₉ N ₃₇ O ₃₃ S ₄	2722.3/2721.3	25.59 ^g
11 [Cys(H) ^{68,74}]CART(62–76)-OH	C ₆₄ H ₉₉ N ₁₇ O ₂₃ S ₃	1569.8/1569.6	28.79 ^g
12 [Cys(Acm) ^{68,74}]CART(62–76)-OH	C ₇₀ H ₁₀₉ N ₁₉ O ₂₅ S ₃	1712.0/1711.7	24.22 ^g
13 [Abu ^{86,94} , Cys(H) ^{88,101}]CART(85–102)-OH	C ₈₄ H ₁₄₁ N ₂₃ O ₂₅ S ₂	1937.3/1937.0	31.27 ^d
14 [Abu ^{86,94}]CART(85–102)-OH(S–S 88–101)	C ₈₄ H ₁₃₉ N ₂₃ O ₂₅ S ₂	1935.3/1935.1	29.80 ^d

^a Determined with FAB MS technique (Micromass, Manchester, England).

^b Retention time in minutes, 25 cm × 0.4 cm column, 5 μm (Vydac, Separations Group, Hesperia, USA), detection at 220 nm.

^c Gradient 40% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

^d Gradient 0–100% of ACN in 0.05% aqueous TFA, 40 min, flow 1 ml/min.

^e Gradient 5–70% ACN in 0.05% aqueous TFA, 60 min, flow 1 ml/min.

^f Gradient 30–90% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

^g Gradient 0–50% ACN in 0.05% aqueous TFA, 50 min, flow 1 ml/min.

^h Gradient 10–70% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

ⁱ Gradient 10–60% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

enex, Torrance, CA, USA) applying 20–25% gradient of acetonitrile in H₂O with 0.1% trifluoroacetic acid in 60 min (flow rate 1 ml/min, UV detection at 215 and 275 nm and gamma detection of the radioactive peptide (Radio-HPLC detector Ramona Star, raytest Isotopenmess geräte GmbH, Straubenhardt, Germany, equipped with BGO cell)). The molecular weights of the iodinated peptides were determined by MALDI-TOF, Reflex IV mass spectrometry (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Identification of methionine⁶⁷ oxidation was accomplished by LC-MS/MS (2D CapLC chromatograph with Q-TOF micromass spectrometer (Waters-Micromass, Milford, MA, USA)) after tryptic digestion. The iodinated or non-iodinated CART(61–102) was digested with trypsin (0.03 µg/µl) for 8 h at 37 °C in 50 mM ethylmorpholine acetate buffer pH 8.1, 10% acetonitrile and 0.01% β-mercaptoethanol [28].

Specific activity of ¹²⁵I-CART(61–102) was about 2000 Ci/mmol. The peptide was kept in aliquots at –20 °C and used for binding studies within 1 month.

2.3. Cell culture

Rat pheochromocytoma cell line PC12 was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). The cells were grown in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 4.5 g/l glucose, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1.5 g/l sodium bicarbonate, pH 7.4, and passaged once a week to maintain the cells in exponential growth. For binding studies, cells were seeded on polyethylene imine-coated 24-well plates (Corning, NY, USA). To reach the density of 5×10^5 cells/well, which was found optimal for binding experiments, non-differentiated cells were allowed to grow for 2 days. Differentiation of cells was performed by addition of the nerve growth factor (50 ng/ml) to the fresh medium on days 1, 3, and 5. On day 7, the cells at a density of 5×10^5 cells/well were used in the experiment. The differentiation was checked microscopically and the number of cells per well was counted before and after the experiment.

2.4. Binding to intact plated cells

Competition binding experiments were performed according to Motulsky and Neubig [27].

Plated cells were incubated with 10^{-10} M ¹²⁵I-CART(61–102) and 10^{-11} to 10^{-3} M non-radioactive CART peptides, in a total volume of 0.25 ml of binding buffer (20 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 1 mg/ml BSA, and 0.1 mg/ml basic pancreatic trypsin inhibitor) for 30 min at 37 °C. Non-specific binding was determined using CART(61–102) in concentration 10^{-6} M.

After incubation, cells were washed with washing buffer (20 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose) and then solubilized in 0.1N NaOH. Bound radioactivity was determined by γ-counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). The total binding (about 2000 cpm per tube for binding to non-differentiated cells, about 5000 cpm per tube for binding to differentiated cells) amounted to 2–5% of the radioactivity added, the non-specific binding to less than 15% of the total binding. Experiments were carried out in

duplicates at least three times. All compounds tested were dissolved in water and stored frozen in aliquots until used in the experiment.

Linearity (i.e. free Cys residues without disulfide bridges) of peptides 8, 11 and 13 was determined before and after binding experiments by MALDI-TOF mass spectrometry.

2.5. Binding to cell membranes

Cell membranes from non-differentiated PC12 cells were isolated as described earlier [26]. Binding experiments were performed with 50 µg of membrane protein in a total volume of 0.25 ml under conditions optimized previously [26] and described for plated cells. Binding was terminated by quick filtration using a Brandel cell harvester (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). The total binding (about 8000 cpm per tube) was less than 10% of the radioactivity added, the non-specific binding amounted to less than 15% of the total binding. The assays were performed in duplicates at least three times.

2.6. Food intake experiments

Male C57Bl/6 mice from the Institute of Molecular Genetics (Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23 °C and a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00 h). They were given ad libitum water and standard chow diet (St-1, Velaz, Koleč, Czech Republic). All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Act of the Czech Republic Nr. 246/1992.

At the age of 16 weeks, mice were implanted with cannulas into the third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described earlier [26]. Animals were placed into separate cages and allowed to recover from surgery for at least 7 days before being used in the experiment. For 3 days before the food intake experiment, the mice had access to food only from 8:00 to 15:00 h and free access to water for 24 h. The amount of food consumed was monitored.

On the day of the experiment at 8:00, fasted mice were injected i.c.v. with 5 µl of either saline or CART(61–102) or CART(55–102) at a dose of 0.5 µg/5 µl, i.e. 0.1 nmol/mouse (dissolved in saline) or CART peptide fragments 6, 9, 11 and 13 at a dose of 4 nmol/mouse ($n = 6–8$).

Fifteen minutes after i.c.v. injection, mice were given weighed food pellets. Food consumption was followed every 30 min for 5 h. Animals had free access to water during the experiment. The results are expressed in grams of food consumed. The placement of the cannula was verified histologically after the experiment.

2.7. Analysis of binding data and statistics

Data are presented as mean ± S.E.M. Competitive binding curves were plotted using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA) using the best fit for single binding site models (IC₅₀ values were obtained from non-linear regression analysis). Inhibition constants (K_i) were calculated from IC₅₀ using Cheng-Prusoff equation [3].

Food intake data were analyzed by one-way ANOVA (analysis of variance) followed by Tukey post hoc test using

Graph-Pad Software; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Synthesis of CART peptide fragments

Structures of CART peptide fragments used in this study are given in Table 1. Physicochemical properties of the peptides are presented in Table 2.

Linear sequences of the peptides were assembled on solid support using common protocols of peptide synthesis and disulfide bonds were closed by pure oxygen in 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 6.8) as described in the Section 2. The purity of all peptides was higher than 90%.

Peptide 1 is N-terminal hexapeptide of CART(61–102). Peptides 2–5 are sequences of CART(61–102) between cysteines 68–74, 74–86, 88–94, 94–101, where cysteines were replaced by glycines (peptides 2–4) or Gly and Ala (peptide 5) (see Table 1 and structure of CART peptide in Thim et al. [29]). Peptides 6 and 7 with cysteines both on the N- and C-terminus are cyclic analogs of peptide 3, they differ only in their C-terminal group that is either an amide or a free carboxyl, respectively. Compounds 9 and 10 correspond to sequence 62–86, and contain three Cys residues with one of them blocked by Ac, i.e. Cys(Ac)⁶⁸ in peptide 10 and Cys(Ac)⁷⁴ in peptide 9, which enables formation of disulfide bridges in two different positions (Table 1). Peptide 8 is a linear precursor of peptide 9.

Linear peptides 11 and 12 consist of 15 amino acids, compound 11 contains two free cysteines, protection of these cysteines^{68,74} by Ac groups secures linearity of peptide 12.

Finally, linear peptide 13 and its cyclic derivative 14 corresponds to the C-terminal part of CART(61–102); both have been already reported by Dylag et al. [9,10] and were re-synthesized by us.

3.2. Iodination of CART(61–102)

CART(61–102) was mono-iodinated with both radioactive and stable isotope. Under reaction conditions described in Section 2, four major peaks were found both in radioactive and non-radioactive preparations by means of HPLC with retention times of 40.7, 41.7, 44.4 and 45.8 min (not shown). The peaks were identified as mono-iodinated peptide with oxidized Met⁶⁷ (MW/M + H⁺ 4657 expected/4657.770 found), mono-iodinated peptide (4641 expected/4643.078 found), di-iodinated peptide with oxidized Met⁶⁷ (4783 expected/4785.382 found) and di-iodinated peptide (4767 expected/4768.467 found) by mass spectrometry. Typically, mono-iodinated CART(61–102) made about 50% of peptide content. The original peptide CART(61–102) was not present in the peptide mixture after the iodination procedure.

LC-MS/MS analysis of tryptic digests of iodinated CART (61–102) and non-iodinated CART (61–102) confirmed oxidation of methionine in position 67 of the iodinated peptide (results not shown).

3.3. Competitive binding to non-differentiated PC12 cells and cell membranes

For competitive binding studies, 30 min incubation at 37 °C using 50 µg of protein (cell membranes) or 5×10^5 cells (plated intact cells) was routinely used. Typical binding curves to cell

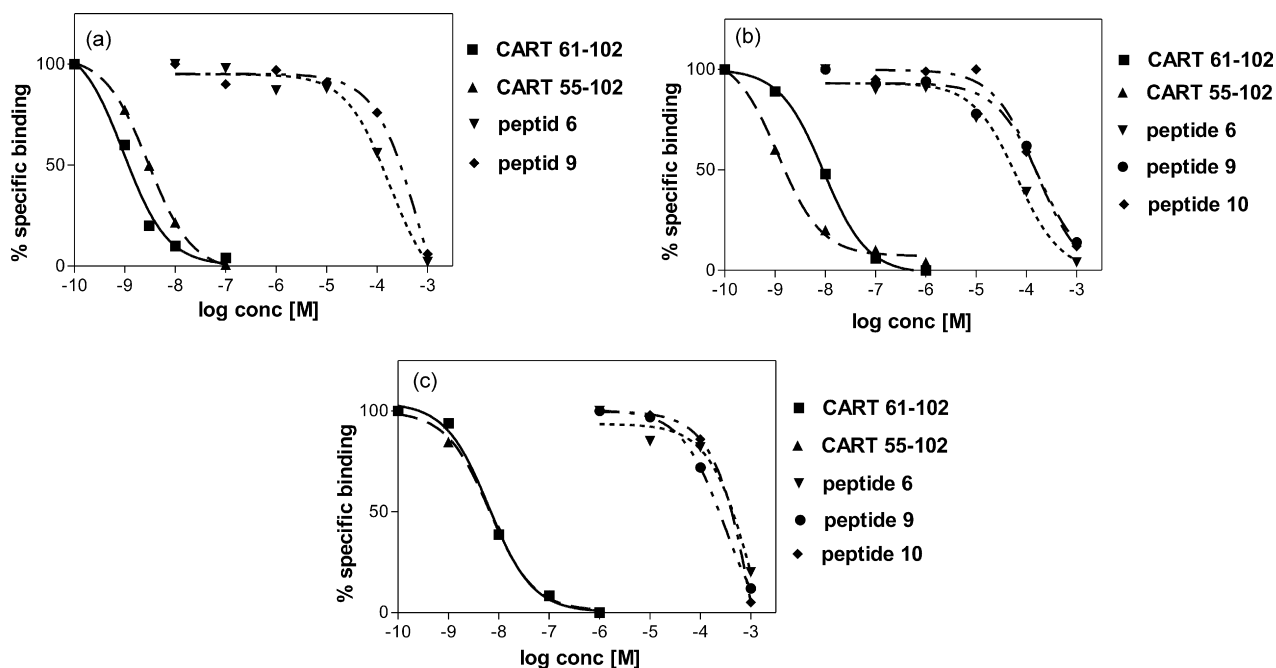


Fig. 1 – Displacement of ¹²⁵I-CART(61–102) binding to (a) membranes from non-differentiated PC12 cells, (b) non-differentiated PC12 cells and (c) NGF-differentiated PC12 cells. ¹²⁵I-CART(61–102) at a concentration of 0.1 nM was displaced by increasing concentrations of CART(61–102), CART(55–102) and CART peptide fragments (30 min incubation at 37 °C). The results are expressed as % of specific binding (after subtraction of non-specific binding in the presence of 10^{-6} M CART(61–102)). A representative example of at least three independent experiments carried out in duplicates.

Table 3 – Displacement of ^{125}I -CART(61–102) binding by CART peptide fragments on PC12 cells

Peptide	K_i (M)		
	Membranes from non-differentiated cells	Non-differentiated cells on plates	Differentiated cells on plates
CART(61–102)	$(2.99 \pm 0.65) \times 10^{-9}$	$(1.36 \pm 2.62) \times 10^{-8}$	$(8.01 \pm 2.14) \times 10^{-9}$
CART(55–102)	$(2.98 \pm 0.33) \times 10^{-9}$	$(1.29 \pm 1.65) \times 10^{-8}$	$(5.40 \pm 0.44) \times 10^{-9}$
1	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
2	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
3	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
4	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
5	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
6	$(1.08 \pm 0.38) \times 10^{-5}$	$(7.29 \pm 2.64) \times 10^{-5}$	$(5.00 \pm 0.26) \times 10^{-4}$
7	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
8	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
9	$(3.98 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(3.96 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	$(4.09 \pm 0.06) \times 10^{-4}$
10	$(4.14 \pm 0.56) \times 10^{-4}$	$(1.62 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(1.26 \pm 0.35) \times 10^{-4}$
11	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
12	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
13	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
14	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$

Mean \pm S.E.M. of at least three separate experiments. K_i was calculated using Cheng–Prusoff equation (concentration of the radioligand was 0.1 nM and K_d taken from saturation experiments was 0.48 nM for non-differentiated cells and 1.90 nM for differentiated cells [26]).

membranes, non-differentiated cells and differentiated cells are shown in Fig. 1a–c.

Results of displacement experiments of ^{125}I -CART(61–102) binding by CART(61–102), CART(55–102) and the synthetic CART fragments 1–14 are summarized in Table 3. CART(61–102) and CART(55–102) have K_i in low 10^{-8} range, peptide 6 in 10^{-5} M range and peptides 9 and 10 in 10^{-4} M range (see Table 3, Fig. 1a and b). The rest of the analogs tested did not displace ^{125}I -CART(61–102) binding even at a concentration of 10^{-4} M (Table 3).

Formation of disulfide bridges due to spontaneous oxidation was checked by mass spectroscopy before and after the experiment; after the incubation, compounds 8 and 11 contained about 10% of oxidized form and compound 13 about 20% (results not shown).

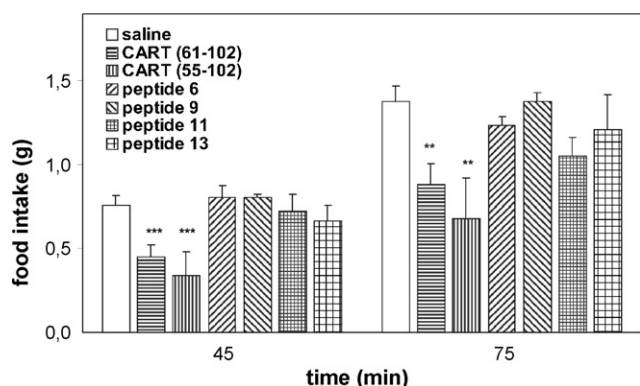


Fig. 2 – Effect of CART(61–102) and CART(55–102) and selected fragments on food intake of fasted mice. CART(61–102) and CART(55–102) were administered i.c.v. in a dose of 0.1 nmol/mouse, peptides 6, 9, 11 and 13 in a dose of 4 nmol/mouse. Food intake was monitored 45 and 75 min after injection and is expressed in grams of food consumed per mouse. Significance is $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ vs. the respective saline-treated group ($n = 6-8$).

3.4. Competitive binding to differentiated PC12 cells

The PC12 cell line was successfully differentiated using NGF treatment to the neuronal phenotype, as described earlier [13]. CART(61–102), CART(55–102) and peptides 9 and 10 were bound to differentiated cells with K_i comparable with that of non-differentiated cells (Table 3, Fig. 1c). Peptide 6 competed with ^{125}I -CART(61–102) for binding to differentiated cells with K_i one order of magnitude higher than to non-differentiated cells (Table 3).

3.5. Food intake experiments

The course of food intake after i.c.v. administration of CART(61–102), CART(55–102) and CART peptide fragments 6, 9, 11 and 13 is shown in Fig. 2. The decrease in food intake after administration of the standard CART(61–102), corresponded to the published values [26], but none of the fragments tested showed any anorexigenic activity even at the 40 times higher dose, i.e. 4 nmol/mouse.

4. Discussion

Most of the in vivo studies with CART peptides have reported on naturally occurring CART(55–102) and/or CART(62–102) with the focus on feeding behavior after i.c.v. injection [9,14,22,29]. Thim et al. [29] first published that CART(54–102), CART(55–102), CART(61–102) and CART(62–102) administered i.c.v. to fasted mice produced a similar dose-dependent decrease in food intake, with CART(55–102) being slightly more potent than the other peptides. Another extensive study comparing effects of i.c.v. injected CART(55–102) and CART(62–102) in fasted mice showed CART(62–102) as five times more potent than CART(55–102) in inhibition of food intake [1].

In our food intake test, i.c.v. administered CART(61–102) lowered food intake in fasted C57 mice significantly and dose-

dependently as described earlier [26]. In this study, an i.c.v. dose (0.1 nmol/mouse) of both CART(55–102) and CART(61–102) resulted in equivalent decrease in food intake, which was statistically significant compared to that of the saline treated controls ($P < 0.001$).

Recently, specific binding of ^{125}I -CART(61–102) to mouse pituitary tumor AtT20 cells [30] and to mouse pheochromocytoma PC12 cells [26] was reported. Non-related peptides such as cholecystokinin, α -melanocyte-stimulated hormone, thyroxin releasing hormone, angiotensin II, neurotensin, and leptin did not displace ^{125}I -CART(61–102) binding to the cell membranes even at a concentration of 10^{-5} M [26]. Binding studies with fragments of the CART peptides can be a powerful tool for comparing affinity of different parts of the molecule and looking for the minimal biologically active structure of the CART peptide.

A comprehensive structure–activity study of various CART peptide fragments in different pharmacological assays conducted under comparable experimental conditions has not been performed yet. Here, for the first time we present the synthesis of series of peptide fragments covering stepwise the structure of the CART(61–102) molecule and describe their binding to pheochromocytoma cells PC12. Peptides that showed affinity to the PC12 cells were tested in the food intake experiment.

Shortened fragments of CART peptides corresponding to sequences of structural loops were tested in order to search for the minimal structure that would still preserve biological activity of the CART peptide.

CART(61–102) was iodinated with a radioactive and a stable isotope. Four peaks were separated by means of HPLC under conditions of narrow gradient of acetonitrile (20–25%) in 60 min; they corresponded to mono- and di-iodinated peptides with unmodified or oxidized Met⁶⁷ (methionine sulfoxide). Mass spectroscopy confirmed that partial oxidation occurs during iodination. In competitive binding experiments to non-differentiated PC12 plated cells, four above-mentioned peptides were displaced identically by increasing concentrations of CART(61–102) (D.B., L.M., unpublished results). This is in agreement with our previously published results showing that iodination of CART(61–102) did not alter affinity of the peptide to PC12 cells [26]. Di-iodinated CART(61–102) was bound to PC12 cells and cell membranes with an affinity similar to that of CART(61–102). We also confirmed partial preservation of the anorexigenic activity of CART(61–102) after its iodination [26]. All competitive binding studies with CART fragments were performed using mono-iodinated ^{125}I -CART(61–102) that formed the major fraction of the iodinated CART(61–102) preparation.

N-terminal peptide 1 and peptides 2–5 corresponding to amino acid sequences between Cys residues of CART(61–102), where cysteines were replaced by glycines (or Ala in position 101) (Table 1), did not bind to PC12 cells or cell membranes in the range of concentrations tested (Table 3).

Peptides 6 and 7 are cyclic analogs of peptide 3; both contain Cys residues at the N- and C-terminus. Even though they differed only in their C-terminal group, they behaved differently. While compound 7 with the COOH group at the C-terminus did not displace ^{125}I -CART(61–102) binding to PC12 cells, compound 6 with the amide group at the C-terminus

was bound to non-differentiated cells and cell membranes with K_i in 10^{-5} M range and to the differentiated ones with K_i in 10^{-4} M range (Table 3, Fig. 1). Affinity of peptide 6 to differentiated cells was 7 times lower compared to non-differentiated ones. The possible reason is that after differentiation to neuronal phenotype, environment of binding site could be altered and/or the CART binding molecule might be modified. However, the receptor for CART peptide has not been characterized yet and therefore, further studies are needed.

Compounds 9 and 10 are elongated versions of compound 6; they differed only in the position of their disulphide bridges (positions 68–86 and 74–86, respectively (Table 1)). They showed comparable binding affinity to both non-differentiated and differentiated cells that was slightly lower than that of peptide 6. Peptide 8, which is the linear analog of 9 and 10, was devoid of any affinity in the range of concentrations tested (Table 3). These findings point to enormous importance of compact cystine knot structure for preservation of binding to putative receptor on PC12 cells.

It was therefore not surprising that in the feeding test, CART peptide fragments 6 and 9 did not inhibit the food intake at the dose of 4 nmol/mouse, i.e. 40 times higher than that used for CART(61–102) and CART(55–102) (Fig. 2). The dose corresponded to the highest doses of CART fragments that were found to affect significantly food intake in the previous studies [17,24]. Regarding peptides 6 and 9, we cannot exclude their possible antagonistic, i.e. orexi-genic character. Couceyro and Fritz [5] showed that unfolded CART(55–102) increased food intake in non-fasted rats. However, we found no significant increase in food intake up to a dose of 4 nmol/mouse (Fig. 2). Further in vitro functional studies with PC12 cells are under investigation.

Linear peptide 11 and its derivative 12 were deduced from already reported CART(62–76) [17,24]. According to these authors, linear peptides CART(55–76) and (62–76), if administered i.c.v. to freely fed rats, attenuated both unstimulated and neuropeptide Y-stimulated food intake. However, in the reports mentioned above, it was not stated clearly whether SH groups in the peptides were oxidized during the experiment or not. In this study, CART(62–76), i.e. compound 11 contained free cysteines while peptide 12 had cysteines^{68,74} protected by Acn groups. Linearity of peptide 11 was confirmed after the binding experiment by mass spectroscopy. As shown in Table 3, neither peptide 11 nor 12 displaced ^{125}I -CART binding to plated PC12 cells and their membranes up to the concentration of 10^{-4} M. Besides, peptide 11 failed to inhibit food intake after its i.c.v. administration to fasted mice (Fig. 2). The discrepancy between our feeding test results and those of Lambert et al. [24] and Kask et al. [17] could be attributed to different animal species (mice versus rats) and experimental design used (fasted versus freely fed animals). However, our feeding test results are in agreement with the data from binding experiments.

Last year, Dylag et al. [9,10] reported synthesis and biological activity of C-terminal derivatives of CART(55–102) with reduced thiol groups, such as linear and cyclic form of [Abu^{86,94}]CART(85–102), and [Abu^{86,88,94,101}]CART(85–102). Both linear CART peptide analogs were able to inhibit amphet-

mine- and cocaine-induced locomotor activity after their i.c.v. administration into mice [10]. Also, naturally occurring CART(55–102) is known to reduce cocaine- [15] or amphetamine- [21] induced locomotion when injected into nucleus accumbens of rats. However, it is difficult to compare the potency of CART(55–102) with that of [Abu^{86,94}]CART(85–102) and [Abu^{86,88,94,101}]CART(85–102), because the authors used different animal models and administration into different brain areas.

We re-synthesized [Abu^{86,94}]CART(85–102) both as a linear peptide **13** and its cyclic derivative **14** (Table 1). Linearity of peptide **13** was checked during binding tests since this peptide is especially susceptible to spontaneous oxidation. The content of oxidized, i.e. cyclic form amounted to about 20% after the binding experiment. Table 3 shows binding of fragments **13** and **14** to PC12 cells and membranes. Both peptides were not able to displace ¹²⁵I-CART(61–102) binding even at 10^{−4} M concentrations. Besides, linear peptide **13** did not show any activity in the feeding test at a dose of 4 nmol/mouse (Fig. 2). In the study of Dylag et al. [9,10] the importance of the C-terminal part of CART peptide molecule for interaction with the opioid system is suggested. However, we propose that the part of CART(61–102) containing all three disulfide bridges is necessary for preservation of the anorexigenic effect.

In conclusion, a series of CART peptide fragments representing different parts of the CART(61–102) molecule were characterized by their binding to non-differentiated and differentiated PC12 cells and cell membranes and by the feeding test in mice. The results showed that a compact structure containing three disulfide bridges is necessary for high affinity binding to PC 12 cells and anorexigenic activity. From all peptides tested, only CART(74–86) and CART(62–86) containing disulfide bridges in positions 74–86 or 68–86 showed low affinity to PC12 cells (about 3 orders of magnitude lower than CART (61–102)). These peptides failed to inhibit food intake after their i.c.v. administration up to a dose of 4 nmol/mouse. As the peptides mentioned correspond to the sequences at the N-terminus of CART (61–102), which seems to form outer loops of the molecule, we conclude that the biological activity of CART peptides is connected rather with the outer N-terminal loops of the molecule than the inner C-terminal ones.

The abundance and wide distribution of CART peptides in the central nervous system and periphery suggest multiple roles of these peptides and the existence of several putative receptors in the mammalian organism. Binding to specific tumor cells with possibly over expressed CART receptor(s), as well as the use of CART peptide fragments for CART research may help to identify CART receptors and further elucidate the physiological role of the CART peptides.

Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 of the Grant Agency of the Czech Republic and Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic. We gratefully acknowledge the excellent technical assistance of H. Hulačová, A. Vytejšková and H. Vysušilová.

REFERENCES

- [1] Bannon AW, Seda J, Carmouche M, Francis JM, Jarosinski MA, Douglass J. Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptides in mice: CART 42–89 and CART 49–89 differ in potency and activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:1021–6.
- [2] Broberger C. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and food intake: behavior in search of anatomy. *Drug Dev Res* 2000;51:124–42.
- [3] Chang CH, Cheng YC. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. *Biochem Pharmacol* 1978;22:3099–108.
- [4] Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* 1997;12:229–31.
- [5] Couceyro PR, Fritz T. Production of recombinant CART peptides in *Escherichia coli* with agonist and antagonist effects on food intake in rats. *Protein Expr Purif* 2003;32:193–5.
- [6] Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 1995;15:2471–81.
- [7] Douglass J, Daoud S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 1996;169:241–5.
- [8] Dun SL, Brailoiu CG, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and sympatho-adrenal axis. *Peptides* 2006;27:1949–55.
- [9] Dylag T, Kotlinska J, Rafalski P, Pachuta A, Silberring J. The activity of CART peptide fragments. *Peptides* 2006;27:1926–33.
- [10] Dylag T, Rafalski P, Kotlinska J, Silberring J. CART(85–102)—inhibition of psychostimulant-induced hyperlocomotion: importance of cyclization. *Peptides* 2006;27:3183–92.
- [11] Ekblad E. CART in the enteric nervous system. *Peptides* 2006;27:2024–30.
- [12] Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849–57.
- [13] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2424–8.
- [14] Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Kuhar MJ. CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:454–9.
- [15] Jaworski JN, Kozel MA, Philpot KB, Kuhar MJ. Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:1038–44.
- [16] Jensen PB, Kristensen P, Clausen JT, Judge ME, Hastrup S, Thim L, et al. The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans. *FEBS Lett* 1999;447:139–43.
- [17] Kask A, Schioth HB, Mutulis F, Wikberg JES, Rago L. Anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide intensifies fear reactions in rats. *Brain Res* 2000;857:283–5.
- [18] Keller PA, Compan V, Bockaert J, Giacobino JP, Charnay Y, Bouras C, et al. Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites. *Peptides* 2006;27:1328–34.
- [19] Kuhar MJ, editor. *Peptides*. 2006. p. 1911–2.

- [20] Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary, and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 1997;9:823–33.
- [21] Kim JH, Creekmore E, Vezina P. Microinjection of CART peptide 55–102 into the nucleus accumbens blocks amphetamine-induced locomotion. *Neuropeptides* 2003;37:369–73.
- [22] Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christiansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1995;39:72–6.
- [23] Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein-coupled receptors. *Neurosci Lett* 2005;384:198–202.
- [24] Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 1998;29:293–8.
- [25] Ludvigsen S, Thim L, Blom AM, Wulff BS. Solution structure of the satiety factor, CART, reveals new functionality of a well-known fold. *Biochemistry* 2001;40:9082–8.
- [26] Maletínská L, Maixnerová J, Matyšková R, Haugvicová R, Šloncová E, Elbert T, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* 2007;559:109–14.
- [27] Motulsky H, Neubig R. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* 1997;Suppl 19:7.5.1–7.5.55.
- [28] Selicharová I, Smutná K, Šanda M, Ubík K, Matoušková E, Bursíková E, et al. 2-DE analysis of a new human cell line EM-G36 derived from breast cancer progenitor cells and comparison with normal mammary epithelial cells. *Proteomics* 2007;7:1549–59.
- [29] Thim L, Nielsen PF, Judge ME, Andersen AS, Diers I, Egel-Mitani M, et al. Purification and characterization of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett* 1998;428:263–8.
- [30] Vicentic A, Lakatos A, Kuhar MJ. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur J Pharmacol* 2005;528:188–9.
- [31] Vicentic A, Lakatos A, Jones D. The CART receptors: background and recent advances. *Peptides* 2006;27: 1934–7.
- [32] Wierup N, Bjorkqvist M, Kuhar MJ, Mulder H, Sundler F. CART regulates islet hormone secretion and is expressed in the β -cells of type 2 diabetic rats. *Diabetes* 2006;55:305–11.

Research article

Open Access

Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice

Lenka Maletínská¹, Jana Maixnerová¹, Resha Matyšková¹,
Renata Haugvicová², Zdeno Pirník³, Alexander Kiss³ and Blanka Železná*¹

Address: ¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 16610 Prague 6, Czech Republic, ²Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14200 Prague 4, Czech Republic and ³Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 3, 83306 Bratislava, Slovak Republic

Email: Lenka Maletínská - maletin@uochb.cas.cz; Jana Maixnerová - maixnerova@uochb.cas.cz; Resha Matyšková - matyskova@uochb.cas.cz; Renata Haugvicová - haugvic@biomed.cas.cz; Zdeno Pirník - ueenpirn@savba.sk; Alexander Kiss - ueenkiss@savba.sk; Blanka Železná* - zelezna@uochb.cas.cz

* Corresponding author

Published: 21 October 2008

Received: 27 May 2008

BMC Neuroscience 2008, 9:101 doi:10.1186/1471-2202-9-101

Accepted: 21 October 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/9/101>

© 2008 Maletínská et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin (CCK) are neuromodulators involved in feeding behavior. This study is based on previously found synergistic effect of leptin and CCK on food intake and our hypothesis on a co-operation of the CART peptide and CCK in food intake regulation and Fos activation in their common targets, the nucleus tractus solitarius of the brainstem (NTS), the paraventricular nucleus (PVN), and the dorsomedial nucleus (DMH) of the hypothalamus.

Results: In fasted C57BL/6 mice, the anorexigenic effect of CART(61-102) in the doses of 0.1 or 0.5 µg/mouse was significantly enhanced by low doses of CCK-8 of 0.4 or 4 µg/kg, while 1 mg/kg dose of CCK-A receptor antagonist devazepide blocked the effect of CART(61-102) on food intake. After simultaneous administration of 0.1 µg/mouse CART(61-102) and of 4 µg/kg of CCK-8, the number of Fos-positive neurons in NTS, PVN, and DMH was significantly higher than after administration of each particular peptide. Besides, CART(61-102) and CCK-8 showed an additive effect on inhibition of the locomotor activity of mice in an open field test.

Conclusion: The synergistic and long-lasting effect of the CART peptide and CCK on food intake and their additive effect on Fos immunoreactivity in their common targets suggest a co-operative action of CART peptide and CCK which could be related to synergistic effect of leptin on CCK satiety.

Background

Information on the metabolic status of the organism enters and is processed in the hypothalamus and in the nucleus tractus solitarius (NTS) of the brainstem (hind-

brain). In the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), adiposity signal leptin influences expression of peptides affecting food intake such as anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART). ARC neurons

project to other hypothalamic areas such as the paraventricular nucleus (PVN) and the lateral hypothalamic area (LHA) (for reviews, see [1-5]). Both PVN and LHA convey neuronal signals to the brainstem where they are integrated with afferent input of cholecystokinin (CCK) [2], satiety peptide of gut origin. For the satiety effect of CCK, leptin signaling in ARC was found necessary [6]. Recently, CCK was shown to facilitate access of leptin to hypothalamic areas and modulate body weight [7].

Satiety effect of CCK is mediated by cholecystokinin A (CCK-A or CCK-1) receptors [8] expressed abundantly not only in the brainstem but also in the hypothalamus [9,10]. Unlike CCK receptors, receptors of CART peptide have not been found yet despite of a well-known anorexigenic effect of CART [3,11,12] and its stimulating effect on anxiety-like reactions [13] or analgesia [14]. Analogously, CART receptor antagonists have not been designed yet.

After its peripheral administration, CCK affected neuronal activity particularly in NTS, the area postrema, the locus coeruleus, PVN, and the dorsomedial nucleus (DMH) [5,15-18]. Similarly, injection of the CART peptide either into the third, fourth, or the lateral ventricle suppressed food intake [11,12,14,19,20] and stimulated expression of c-Fos in NTS, the parabrachial nucleus, PVN and DMH [21,22].

Co-localization of CART peptide and CCK-A receptor in vagal afferent neurons suggested that CART peptide might take part in mediating satiety effects of cholecystokinin [23]. Interestingly, a lowered leptin level after 48-hour food deprivation affected expression neither of CCK-A receptor [23] nor CART in nodose ganglion neurons [24]. However, recently, CART expression in rat vagal afferent neurons was found negligible after 24-hour fasting, up-regulated by CCK, and restored after re-feeding. The action of CCK on CART expression was shown to be mediated by activation of protein kinase C and cAMP response element binding protein (CREB) and was inhibited by orexigenic ghrelin [25].

Relationship between CCK and the CART peptide was documented also at pancreatic exocrine secretion of amylase where the stimulating effect of CART peptide was inhibited *in vivo* but not *in vitro* by CCK-A receptor antagonist devazepide [26].

Finally, a synergistic anorexigenic effect of CCK and CART peptide was suggested in goldfish [27], but no experimental details were given.

Data on interaction of CART peptide with other peptides regulating food intake have been scarce up to now.

Besides the well-known suppression of the orexigenic effect of NPY by CART peptide [11,28], CART peptide-induced hypophagia and brain c-Fos expression was prevented by blocking central receptors for glucagon-like peptide 1 (GLP-1) [29].

The previously described findings point to a neurochemical link between CART peptide and CCK with regard to a previously found synergistic effect of leptin and CCK on food intake [15]. Therefore, in the present study, the idea is proposed that a co-operative action of the CART peptide and CCK might be involved in communication between ARC and NTS. Potential cooperation between central CART peptide and peripheral CCK in the short-term regulation of food intake in lean mice was investigated. To compare neuronal activation after administration of CART peptide, CCK, or simultaneous administration of CART peptide and CCK, c-Fos activation in three important brain areas involved in food intake regulation, PVN, DMH, and NTS, was also determined. In addition, the exploratory behavior of mice after administration of the above-mentioned compounds is described, which is an important element complementing food intake data.

Methods

Materials

Cholecystokinin octapeptide (CCK-8, Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, NeoMPS, Strasbourg, France), CCK-A receptor antagonist devazepide (L364,718) or CCK-B receptor antagonist L365,260 (gift from ML Laboratories, Liverpool, UK) and CART(61-102) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) were used in the experiments.

The Fos (No 94012) antiserum was kindly provided by Dr. J.D. Mikkelsen (NeuroSearch A/S Ballerup, Denmark). The specificity and sensitivity of Fos antiserum have already been tested previously [30].

Experimental animals

Male C57BL/6 mice obtained from the Institute of Molecular Genetics (Prague, Czech Republic) were housed in standard conditions (temperature of 23 °C, daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00)). They were given *ad libitum* water and standard chow diet (St-1, Velaz, Koleč, Czech Republic). They were 14–16 weeks old (25–30 g) when cannulation and following experiments were performed. All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Act of the Czech Republic Nr. 246/1992 and were approved by the Committee for experiments with laboratory animals of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Cannula placement

Mice were implanted with cannulas (Plastics One, Roanoke, USA) into the third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described earlier [31]. Thereafter, the animals were placed into separate cages with free access to food and water and allowed to recover from surgery at least seven days before starting the experiment.

Food intake experiments

Before starting the food intake experiment, the mice were randomly divided into groups of 6–8 mice and were fasted overnight (17 h) with free access to water.

On the day of the experiment, the individual groups of mice underwent the following treatments before being given weighed food (at $t = 0$ around 8:30) and the registration of food intake started.

Experiment 1 Individual and combined administration of CCK-8 and CART(61-102)

Doses, route of administration and time schedule are described in Table 1.

Experiment 2 Individual and combined administration of CCK receptor antagonists and CART(61-102)

Doses, route of administration and time schedule are described in Table 1.

The volume of i.p. injected solutions was 0.2 ml/mouse, i.c.v. injected solutions were of 5 μ l/mouse and were

infused in 20 s using an infusion pump; the infusion cannula was left in place for a further 20 s to prevent reflux. Each animal was used only once, the experiment was repeated with a new set of mice.

At $t = 0$ min, i.e. 15 min after i.c.v. injection of CART(61-102) or 20 min after i.p. injected CCK-8 and 45 min after i.p. injection of devazepide or L365,260, mice were given weighed food pellets. The pellets were replaced with fresh ones every 30 min and weighed. Food intake was followed for 5 h. Animals had free access to water during the experiment. The results are expressed in grams of food consumed per mouse. The placement of the cannula was verified histologically.

Fos Immunohistochemistry

Tissue processing

For Fos immunohistochemical processing, overnight fasted mice ($n = 5$ mice/group) were treated: a/i.c.v. with saline, b/i.p. with CCK-8 (0.4 μ g/kg), c/i.c.v. with CART(61-102) (0.1 μ g/mouse) or d/i.p. with CCK-8 followed by i.c.v. injected CART(61-102) (doses as described above). The time schedule of injections was identical as in the food intake study (Table 1). Sixty minutes after i.c.v. injection, the mice were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, and 10% picric acid (w/w). Then the brains were removed, postfixed in the same fixative overnight at 4°C, and infiltrated with 30%

Table 1: Administration of compounds in mice, in food intake Experiment 1 and 2

Experiment 1						
Compound	Dose i.p.	Time of application	Compound	Dose i.c.v.	Time of application	No. animals
saline		-20 min				8
CCK-8	0.4 μ g/kg	-20 min				6
	4	-20 min				6
			saline		-15 min	8
			CART	0.1 μ g/mouse	-15 min	6
				0.5	-15 min	6
CCK-8	0.4 μ g/kg	-20 min	CART	0.1 μ g/mouse	-15 min	6
	4	-20 min		0.1	-15 min	6
	0.4 μ g/kg	-20 min		0.5 μ g/mouse	-15 min	6
	4	-20 min		0.5	-15 min	7
Experiment 2						
devazepide	1 mg/kg	-45 min				6
	1	-45 min	CART	0.1 μ g/mouse	-15 min	6
	1	-45 min		0.5	-15 min	6
L365,260	1 mg/kg	-45 min				6
	1	-45 min		0.5	-15 min	7

At time = 0 min, mice were given weighed food pellets.

sucrose in 0.1 M PB for 48 h at 4°C. Before sectioning, the brains were rapidly (20 sec) frozen in cold isopentane (-30/-40°C) and placed into a Reichert cryocut device adjusted to -16°C for 1 h. Location of i.c.v. cannulas in the third ventricle was verified during sectioning and 30 µm coronal sections were cut from the brains and collected as free floating in cold (4°C) PB.

Immunohistochemistry

Free floating sections were repeatedly washed in cold PB followed by preincubation in 3% H₂O₂ for 40 min at room temperature. They were incubated with polyclonal Fos protein antiserum (1:2000), diluted in 0.1 M PB containing 4% normal goat serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0.5% Triton X-100 (Koch-Light Lab. Ltd., Colnbrook, Berks, England), and 0.1% sodium azide for 48 h at 4°C. After several rinses in PB, the sections were incubated with biotinylated goat-anti-rabbit IgG (1:500, VectorStain Elite ABC, Vector Lab., Burlingame, CA, USA) for 90 min at room temperature. Next PB rinses were followed by incubation with the avidin-biotin peroxidase complex (1:250) for 90 min at room temperature. PB washing was followed by washing in 0.05 M sodium acetate buffer (SAB, pH 6.0). The Fos antigenic sites were visualized with 0.0266% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) dissolved in SAB containing 0.0042% H₂O₂ and 2.5% nickel ammonium sulfate, for 7 min. The metal-intensification of DAB produced black staining in the labeled nuclei. Finally, the sections were rinsed in 0.05 M SAB, mounted into 0.1% of gelatine dissolved in 0.0125 M SAB, air-dried and coverslipped with Permount (Sigma, St. Louis, MO, USA). Immunostaining of negative control, which did not show any antiserum immunolabeling, included substitution of the primary antiserum with normal rabbit serum, and sequential elimination of the primary or secondary antibody from the staining series.

Evaluation of the immunostaining

An identical set of mice was used for determination of Fos immunoreactivity in NTS, PVN, and DMH. Counting of Fos immunoreactive cells within the NTS, from Bregma -7.48 mm to Bregma -7.32 mm, PVN, from Bregma -0.7 mm to -0.94 mm, and DMH, from Bregma -1.46 mm to -1.82 mm according to the mouse brain atlas [32], was performed separately in each side of the sections. Quantitative assessment was performed from the images captured with a Canon digital camera (PowerShot S40) and Leica DMLS light microscope in a computer screen obtained from 5–6 brain sections per animal. Representative sections were captured by the same computerized system. The counting of Fos-positive neurons was done by one of the authors under blinded conditions (the counted slides from each animal were analyzed independently and randomly and encoded by other person).

Open field locomotor activity

Locomotor activity was measured using the VideoMot system (TSE Systems, Bad Homburg, Germany). *Ad libitum* fed mice were placed individually in the open field (1 × 1 m) and their locomotor activity, i.e. total distance traveled, was measured for 10 min. Mice were administered with i.p. injection of CCK-8 (4 µg/kg), i.p. injection of devazepide (1 mg/kg), i.c.v. administration of CART(61-102) (0.1 and 0.5 µg/mouse) or their combination with a time schedule as described in feeding experiments in Table 1 (n = 5 mice/group).

Statistics

Data are presented as means ± SEM for the number of animals indicated in the Figures. They were analyzed by the non-repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post hoc* test using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). P < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Synergistic action of CART peptide and CCK-8 in food intake of fasted lean mice

Experiment 1

Cumulative food intake of male C57BL/6 mice was measured for all doses of compounds described in Methods (Table 1) and is illustrated by curves in Fig. 1. The feeding response to saline injected i.p. or i.c.v. did not show any significant difference.

CART(61-102) at a dose of 0.5 µg/mouse significantly attenuated food intake up to 105 min after its i.c.v. injection with maximum between 45 and 75 min after i.c.v. injection, i.e. after the first and second measurements of food intake (Fig. 1). A dose-dependent anorexigenic effect of CART(61-102) is obvious in Fig. 2a. In C57BL/6 fasted mice, CCK-8 doses of 0.4 and 4 µg/kg i.p. did not significantly modify food intake (Fig. 2a).

Simultaneous application of CCK-8 and CART(61-102) reduced food intake more significantly than each single peptide (Fig. 1, 2a), and the effect lasted for more than five hours (Fig. 1). Doses of CCK-8 (0.4 and 4 µg/kg) increased the anorexigenic effect of CART(61-102) in a dose-related way (Fig. 2a). Table 2 summarizes values of food intake at the time of maximal effect of administered peptides (30 minutes after addition of pellets).

Experiment 2

CCK-A receptor inactivation with its antagonist devazepide prevented the anorexigenic effect of CART(61-102) (0.1 and 0.5 µg/mouse), whereas the specific CCK-B receptor antagonist L-365,260 did not affect the CART-induced decrease in food intake (Fig. 2b, Table 2).

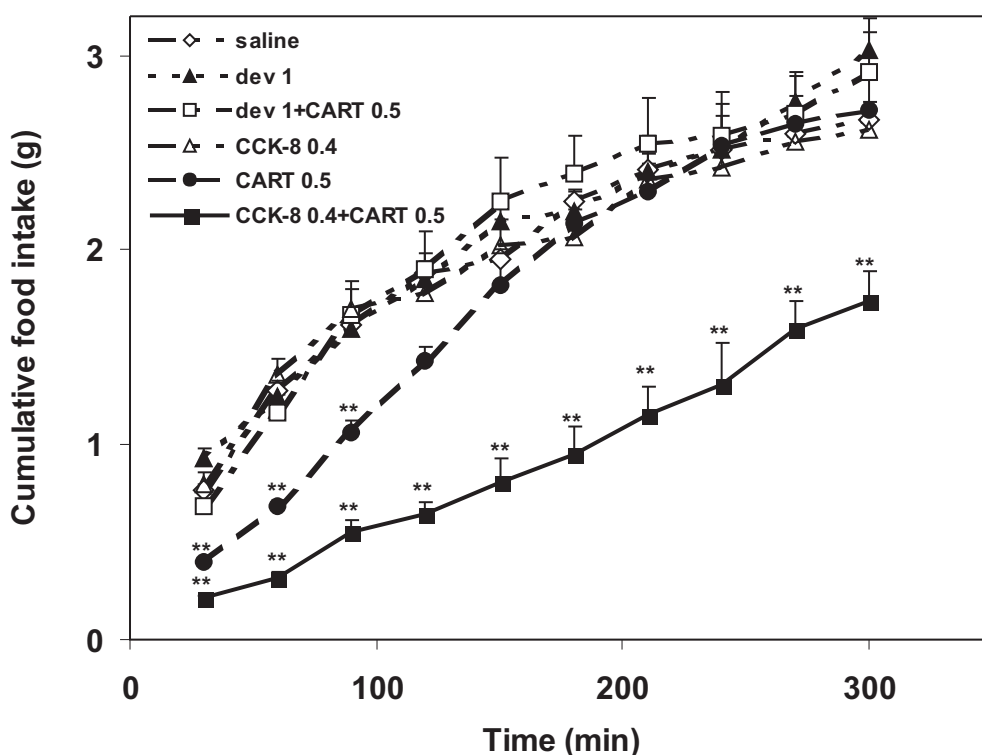


Figure 1

Cumulative food intake of 17-h fasted mice after administration of CCK-8 (0.4 μ g/kg, i.p.), devazepide (1 mg/kg, i.p.) or after administration of saline (i.c.v.), CART(61-102) (0.5 μ g/mouse, i.c.v.), CCK-8 (0.4 μ g/kg, i.p.) followed by CART(61-102) (0.5 μ g/mouse, i.c.v.), and devazepide (1 mg/kg, i.p.) followed by CART(61-102) (0.5 μ g/mouse, i.c.v.). At time 0, weighed food was given to mice. Food intake is expressed in grams of food consumed ($n = 6-8$ mice per group). ** $P < 0.01$ vs. saline-treated group [ANOVA, $F_{4,39} = 5.92$].

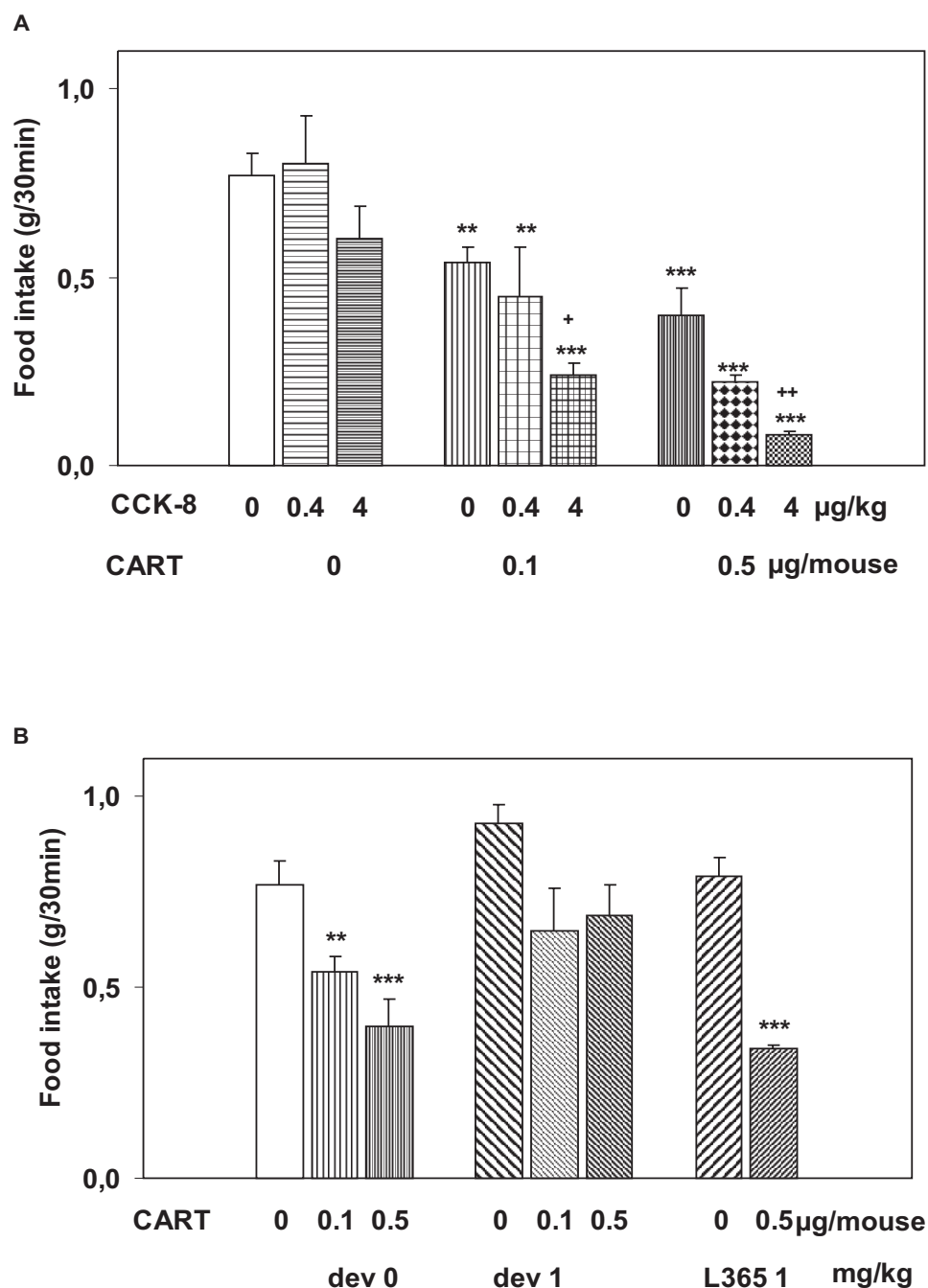
Fos immunoreactivity in NTS, PVN, and DMH after CART peptide and CCK administration

The doses of CCK-8 (4 μ g/kg) and CART(61-102) (0.1 μ g/mouse) used by us for determination of Fos immunoreactivity correspond to those used previously by others [18,19,30]. Statistical analysis by one way ANOVA documented the impact of CCK-8, CART(61-102) as well as their combined treatment on the number of Fos immunopositive cells both in NTS ($F_{3,16} = 26.23$, $p < 0.000001$), PVN ($F_{3,13} = 100.35$, $p < 0.000001$), and DMH ($F_{3,12} = 58.19$, $p < 0.000001$) in lean C57BL/6 mice (Fig. 3).

In NTS, the Fos immunoreactivity in saline-treated controls was minimal and sporadic (Fig. 3a). The number of Fos immunoreactive cells distinctly increased after i.p. application of CCK-8 (0.4 μ g/kg) compared with saline-treated mice ($P < 0.05$) (Fig. 3a, d). A similar, but statistically insignificant increase was observed after i.c.v. infusion of CART(61-102) (0.1 μ g/mouse). The *post hoc* test showed a significant effect ($P < 0.01$) of parallel administration of CCK-8 and CART peptide on the Fos activation

of cells in NTS in comparison with all other groups of animals (Fig. 3a, d).

In PVN and DMH, Fos immunoreactivity followed a similar trend as in the NTS. In control animals, a weak Fos signal was found (Fig. 3b,c). A significant increase in Fos immunoreactivity was registered after application of CCK-8 ($p < 0.01$), CART(61-102) ($p < 0.01$), and parallel administration of CCK-8 and CART(61-102) ($p < 0.01$) in comparison with saline-treated mice (Fig. 3b, d). The *post hoc* test revealed a significantly higher increase in the number of Fos-immunopositive cells in PVN and DMH after CART(61-102) application compared with application of CCK-8 (Fig. 3b, c); simultaneous application of the above-mentioned peptides ($p < 0.01$) activated Fos in PVN and DMH more significantly than each particular peptide alone ($p < 0.01$).

**Figure 2**

Dose-related inhibition of food intake in 17-h fasted mice after administration of: A/ CCK-8 (0.4 and 4 $\mu\text{g/kg}$, i.p.) or i.c.v. saline, CART(61-102) (0.1 and 0.5 $\mu\text{g/mouse}$, i.c.v.), CCK-8 (0.4 and 4 $\mu\text{g/kg}$, i.p.) plus CART(61-102) (0.1 and 0.5 $\mu\text{g/mouse}$, i.c.v.), or B/ i.p. devazepide (1 mg/kg) alone or followed by i.c.v. CART(61-102) (0.1 and 0.5 $\mu\text{g/mouse}$) and i.p. L365,260 (1 mg/kg) alone or followed by i.c.v. CART(61-102) (0.5 $\mu\text{g/mouse}$). Food intake is expressed in grams of food consumed in the first 30 min after presentation of food ($n = 6-8$ mice per group). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. saline-treated group, + $P < 0.05$ vs. CART(61-102) 0.1 $\mu\text{g/mouse}$, ++ $P < 0.05$ vs. CART(61-102) 0.5 $\mu\text{g/mouse}$ [ANOVA, $F_{12,78} = 13.88$]. CART – CART(61-102), dev – devazepide, L365 – L365,260.

Table 2: Food intake of 17-h fasted mice during first 30 min measured (maximal effect) in Experiment 1 and 2

Compound/dose				Food intake/30 min (g \pm SEM)
i.p.		i.c.v.		
saline		saline		0.77 \pm 0.06
				0.73 \pm 0.07
CCK-8	0.4 μ g/kg 4	CART	0.1 μ g/mouse 0.5	0.80 \pm 0.13
				0.60 \pm 0.09
	0.4 μ g/kg 4	CART	0.1 μ g/mouse 0.1	0.54 \pm 0.04 **
				0.40 \pm 0.07 ***
CCK-8	0.4 μ g/kg 4	CART	0.5 μ g/mouse 0.5	0.45 \pm 0.13 **
				0.24 \pm 0.03 *** +
CCK-8	0.4 μ g/kg 4	CART	0.5 μ g/mouse 0.5	0.22 \pm 0.02 ***
				0.08 \pm 0.01 *** ++
devazepide	1 mg/kg 1 1	CART	0.1 μ g/mouse 0.5	0.93 \pm 0.05
				0.65 \pm 0.11
				0.69 \pm 0.08
L365,260	1 1		0.5	0.79 \pm 0.05
				0.34 \pm 0.01 ***

P < 0.01, *P < 0.001 versus saline-treated group. +P < 0.05 versus group treated by CART, 0.1 μ g/mouse, ++ P < 0.01 versus group treated by CART, 0.5 μ g/mouse.

Behavioral effect after parallel CART peptide and CCK-8 injection

Open field locomotor activity of fed lean mice was measured for 10 min after i.c.v. administration of CART(61-102), i.p. administration of CCK-8 and devazepide or their combination (see Methods). The goal was to find out whether in behavioral tests, the additive effect of CART peptide and CCK-8 occurred similarly as in the food intake experiments. The results clearly showed (Fig. 4) that the CART peptide (0.5 μ g/mouse) alone or in combination with CCK-8 (4 μ g/kg) significantly shortened the distance traveled in the open field compared to that of the saline-treated group. The decrease of locomotor activity after CART peptide treatment was reversed by CCK-A antagonist devazepide (Fig. 4).

Discussion

In this study, the effect of simultaneous administration of CART peptide and CCK on food intake, Fos immunoreactivity in NTS, PVN, and DMH and locomotor activity points to a positive cooperation between the CART peptide and CCK.

Intracerebroventricular injections of CART(61-102) into the third ventricle of fasted C57BL/6 mice attenuated food intake (Fig. 1, 2) in a dose-dependent manner similarly as in the studies of Thim *et al.* [12], Bannon *et al.* [14] and Vrang *et al.* [22]. At the doses of 0.4 and 4 μ g/kg, CCK-8 did not show any significant effect on food intake in fasted C57BL/6 mice (Fig. 2a) (with EC₅₀ about 15 μ g/kg determined in a preliminary study), unlike fasted outbred

NMRI mice that were sensitive to CCK-8 dose of 4 μ g/kg (with EC₅₀ about 9 μ g/kg [31]). Serum leptin after 17 h fasting was 50% higher in the robust NMRI mice compared to the subtle C57BL/6 mice (0.45 \pm 0.14 ng/ml in NMRI [33] and 0.30 \pm 0.06 ng/ml in C57BL/6 male mice, our non-published data), which was probably the reason why the threshold dose for CCK-8 was higher in C57BL/6 than in NMRI mice (4 versus 0.4 μ g/kg, respectively).

The 48-hour long fasting was shown to attenuate the satiety response to CCK because of a lowered leptin level [34]. Barrachina *et al.* [15] demonstrated that leptin cooperated synergistically with satiety effect of CCK in 24-hour fasted C57BL/6 mice [15]. Therefore in this study, it is supposed that synergistic co-operation of leptin and CCK was preserved in 17-hour fasted C57BL/6 mice despite lowered leptin level after fasting.

In this study, low doses of CCK enhanced the anorexigenic effect of CART peptide in a dose-dependent way and prolonged the time of the CART peptide effect (Fig. 1) that was in agreement with our hypothesis on a synergistic effect of CART(61-102) and CCK-8 on food intake (Fig. 2a). A direct involvement of CCK-A receptor in the anorexigenic effect of CART peptide was demonstrated in this study, because selective CCK-A receptor antagonist devazepide [8] was found to block the effect of CART peptide on food intake (Fig. 2b). Similarly, the anorexigenic action of CART peptide in rats was prevented by GLP-1 receptor antagonist [29]. The fact that L365,260, selective CCK-B receptor antagonist, which is not involved in food

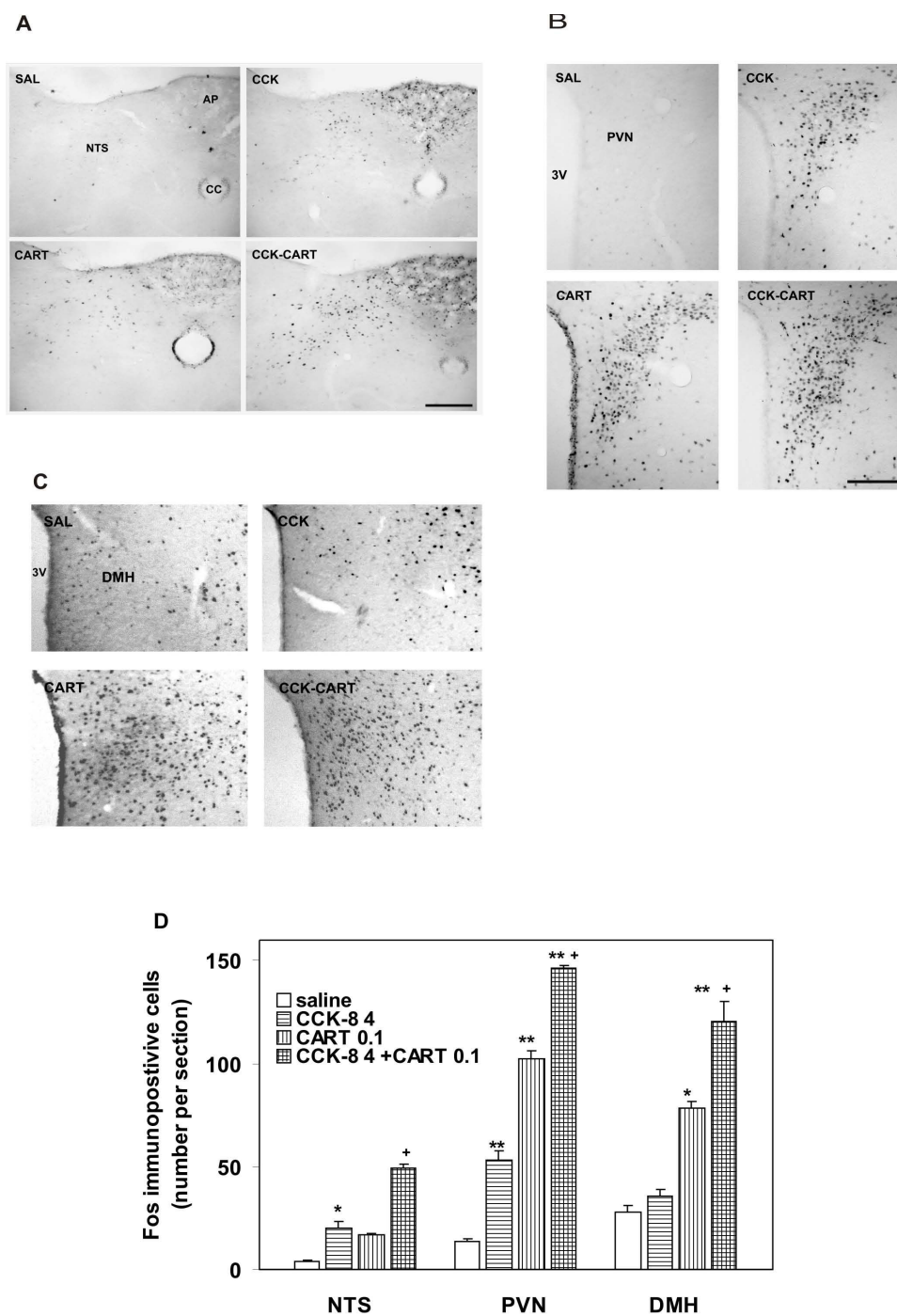


Figure 3

Fos immunoreactivity: Fos-immunostained cells in coronal section of A/ NTS, B/ PVN, C/ DMH, D/ Number of Fos-immunopositive cells in NTS, PVN and DMH 60 minutes after i.c.v. application of saline (SAL), CCK-8 (4 µg/kg, i.p.), CART(61-102) (0.1 µg/mouse, i.c.v.), and their combination expressed unilaterally per animal (n = 4–5) and section (n = 5–6). * P < 0.01 vs. SAL, CCK and CART, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. SAL [ANOVA, for NTS $F_{3,16} = 26.23$, for PVN $F_{3,13} = 100.35$, for DMH $F_{3,12} = 58.19$]. SAL – saline, NTS – solitary tract nucleus, CC – central canal, AP – area postrema, PVN – paraventricular nucleus. Bar = 100 µm.

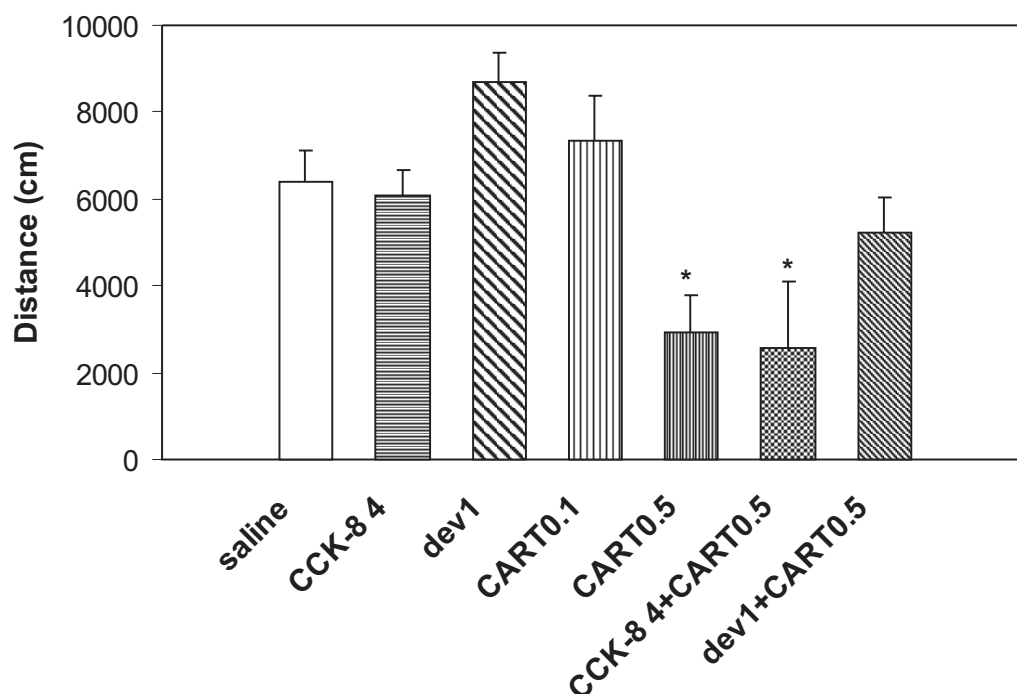


Figure 4

Behavioral activity of fed mice (open field test, total distance traveled for 10 min) after i.p. administration of CCK-8 (4 µg/kg) or devazepide (1 mg/kg), after i.c.v. administration of saline, CART(61-102) (0.1 and 0.5 µg/mouse), or after combined injection of i.p. CCK-8 or devazepide followed by i.c.v. CART(61-102). ** $P < 0.01$ vs. saline-treated group [ANOVA, $F_{6,38} = 6.29$]. CART – CART(61-102), dev – devazepide, L365 – L365,260.

intake regulation [8], did not alter the decrease in food intake induced by the CART peptide (Fig. 2b) supported the idea of the involvement of exclusively CCK-A receptor type in its co-operation with the CART peptide.

Co-administration leptin with CCK-8 in a dose of 3.5 µg/kg i.p. that was considered subthreshold potentiated satiety and activation of brainstem neurons in lean C57BL/6 mice and also enhanced the number of Fos-positive neurons in PVN [15]. In this study, the Fos immunoreactivity after injection of the CART peptide or/and CCK-8 was determined in NTS, PVN, and DMH, common targets of CART peptide [21,22] and CCK [5,15-18], in the identical set of mice. A strong increase in the number of Fos-positive cells was found (Fig. 3) when the dose of CART peptide that significantly attenuated food intake was co-administered with a dose of CCK-8 that did not influence food intake; this response was more significant than the response to each particular peptide. This result confirmed the co-operation between the CART peptide and CCK-8 in the brainstem and hypothalamic PVN and DMH, where satiety signals originating in the periphery as well as in the forebrain are processed. PVN is highly innervated by affer-

ent projections from DMH. It was shown that CCK might activate corticotropin-releasing factor (CRF) neurons in DMH [18] via noradrenergic projections from NTS [35]. This pathway could contribute to the additive effect of CCK and CART peptide in the DMH.

Finally, behavioral data followed the trend of the feeding tests. CART peptides are known to influence locomotor activity and analgesia [13,14]. However, the significance of the effects differed in different studies. In this study, a dose of CCK-8 that did not attenuate food intake (4 µg/kg i.p.) did not also significantly lower the locomotor activity of C57BL/6 mice in the open field test (Fig. 4), while CART(61-102) at a dose of 0.5 µg/mouse and its combination with CCK-8 significantly suppressed the distance traveled in open field test. Analogously, devazepide alone did not significantly affect the locomotor activity of mice compared to the saline-treated group but blocked the effect of CART peptide (Fig. 4). These findings again suggest that the effect of CART peptide was pronounced through activation of CCK-A receptor and point to satiety-related sedation. Analgesic hot-plate test was also performed, but none of the above-mentioned compounds

significantly changed the paw-licking latency compared to the saline-treated group (data not shown).

The long lasting effect of synergistic action of CCK and the CART peptide in this study could be interpreted according to de Lartigue *et al.* [25] as a result of CCK-induced expression of CART and a consequent effect of the endogenously produced CART peptide after the exogenous CART peptide was exhausted. On the other hand, Broberger *et al.* described that expression of CCK-A receptor does not depend on the metabolic status [23].

The integratory role of the ARC-PVN-DVC (dorsal vagal complex in which NTS is included) was suggested for the synergistic action of leptin and CCK on the attenuation of food intake and body weight [15]. Food intake was affected by parallel administration of leptin and CCK more potently than by individual application of the hormones and lasted at least 7 h. Leptin and CCK activation pathways appeared to overlap at three discrete nuclei: the PVN, parabrachial nucleus and NTS [5].

Conclusion

In this study, the synergistic effect of CCK and CART peptide on food intake targeted hypothalamic PVN and DMH and NTS, which suggested that CART peptide might act as a mediator of the leptin anorexigenic effect both in the hypothalamus and brainstem. Identification of the CART peptide receptor and designing its antagonist is necessary for identification of further possible cooperative actions of the CART peptide.

Authors' contributions

LM and BŽ designed the study, drafted the manuscript and performed the statistical analysis. LM, JM, RM and BŽ carried out the majority of the experiments and data collection. RH participated in implantation of cannulas. ZP and AK performed immunohistochemistry. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 of the Grant Agency of the Czech Republic and Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

We gratefully acknowledge the excellent technical assistance of A. Vytečková and H. Vysušilová.

References

- Broberger C: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and food intake: behavior in search of anatomy.** *Drug Dev Res* 2000, **51**:124-142.
- Broberger C: **Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks.** *J Int Med* 2005, **258**:301-327.
- Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Kuhar MJ: **CART in feeding and obesity.** *TRENDS Endocrinol Metab* 2004, **15**:454-459.
- Luckman SM, Lawrence CB: **Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle.** *TRENDS Endocrinol Metab* 2003, **14**:60-65.
- McMinn JE, Baskin DG, Schwartz MW: **Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight.** *Obes Rev* 2000, **1**:37-46.
- Morton GJ, Blevins JE, Williams DL, Niswender KD, Gelling RW, Rhodes CJ, Baskin DG, Schwartz MW: **Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals.** *J Clin Invest* 2005, **115**:703-710.
- Merino B, Cano V, Guzman R, Somoza B, Ruiz-Gayo M: **Leptin-mediated hypothalamic pathway of cholecystokinin (CCK-8) to regulate body weight in free-feeding rats.** *Endocrinology* 2008, **149**:1994-2000.
- Moran TH, Ameglio PJ, Schwartz GJ, McHugh PR: **Blockade of type A, not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK.** *Am J Physiol* 1992, **262**:R46-R50.
- Lodge DJ, Lawrence AJ: **Comparative analysis of the central CCK system in Fawn Hooded and Wistar Kyoto rats: extended localisation of CCK-A receptors throughout the rat brain using a novel radioligand.** *Regul Pept* 2001, **99**:191-201.
- Mercer LD, Beart PM: **Histochemistry in rat brain and spinal cord with an antibody directed at the cholecystokinin A receptor.** *Neurosci Lett* 1997, **225**:97-100.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S: **Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin.** *Nature* 1998, **393**:72-76.
- Thim L, Nielsen PF, Judge ME, Andersen AS, Diers I, Egel-Mitani M, Hastrup S: **Purification and characterization of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast.** *FEBS Letters* 1998, **428**:263-268.
- Kask A, Schiöth HB, Mutulis F, Wikberg JES, Rago L: **Anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide intensifies fear reactions in rats.** *Brain Res* 2000, **857**:283-285.
- Bannon AV, Seda J, Carmouche M, Francis JM, Jarosinski MA, Douglass J: **Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptides in mice: CART 42-89 and CART 49-89 differ in potency and activity.** *J Pharmacol Exp Ther* 2001, **299**:1021-1026.
- Barrachina MD, Martinez V, Wang L, Wei JY, Taché Y: **Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:10455-10460.
- Monnikes H, Lauer G, Arnold R: **Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat.** *Brain Res* 1997, **770**:277-288.
- Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V, Voort IR van der, Veh RW, Werner CR, Klapp BF, Wiedenmann B, Wang L, Taché Y, Monnikes H: **CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **288**(3):R751-R758.
- Kobelt P, Paulitsch S, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, Voort IR van der, Tebbe JJ, Veh RW, Klapp BF, Wiedenmann B, Taché Y, Monnikes H: **Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.** *Brain Res* 2006, **1117**:109-117.
- Aja S, Sahand S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH: **Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001, **281**(6):R1862-R1867.
- Zheng H, Patterson C, Berthoud H-R: **Fourth ventricular injection of CART peptide inhibits short-term sucrose intake in rats.** *Brain Res* 2001, **896**:153-156.
- Zheng H, Patterson LM, Berthoud H-R: **CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake.** *Brain Res* 2002, **957**:298-310.
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, Kristensen P: **Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour.** *Brain Res* 1999, **818**:499-509.

23. Broberger C, Holmberg K, Kuhar MJ, Hökfelt T: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nervus vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:13506-11.
24. Broberger C, Holmberg K, Shi T-J, Dockray , Hökfelt T: **Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia.** *Brain Res* 2001, **903**:128-140.
25. de Lartigue G, Dimaline R, Varro A, Dockray GJ: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin.** *J Neurosci* 2007, **27**:2876-2882.
26. Cowles RA, Segura BJ, Mulholland MW: **Stimulation of rat pancreatic exocrine secretion by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide.** *Regul Pept* 2001, **99**:61-68.
27. Volkoff H: **The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish.** *Comp Biochem Physiol Part A* 2006, **144**:325-31.
28. Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ: **CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y.** *Synapse* 1998, **29**:293-298.
29. Aja S, Ewing C, Lin J, Hyun J, Moran TH: **Blockade of central GLP-1 receptors prevents CART-induced hypophagia and brain c-Fos expression.** *Peptides* 2006, **27**:157-164.
30. Kiss A, Palkovits M, Skirboll LR: **Light microscopic-triple-colored immunohistochemical staining on the same vibratome section using the avidin-biotin-peroxidase complex technique.** *Histochemistry* 1988, **88**:353-356.
31. Maletínská L, Maixnerová J, Matyšková R, Haugvicová R, Šloncová E, Elbert T, Slaninová J, Železná B: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12.** *Eur J Pharmacol* 2007, **559**:109-114.
32. Franklin KBJ, Paxinos G: *The mouse brain in stereotaxic coordinates* New York: Academic Press; 1997.
33. Maletínská L, Shamas Toma R, Pirník Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M, Železná B: **Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice.** *Regul Pept* 2006, **136**:58-63.
34. McMinin JE, Sindelar DK, Havel PJ, Schwartz MW: **Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin.** *Endocrinology* 2000, **141**:4442-4448.
35. Sawcheko PE, Swanson LW: **The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat.** *Brain Res* 1982, **257**:275-325.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Anorexigenic Effect of Cholecystokinin is Lost but That of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) Peptide Is Preserved in Monosodium Glutamate Obese Mice

B. ŽELEZNÁ¹, J. MAIXNEROVÁ¹, R. MATYŠKOVÁ¹, R. HAUGVICOVÁ²,
D. BLOKEŠOVÁ¹, L. MALETÍNSKÁ¹

¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, ²Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received January 23, 2008

Accepted September 8, 2008

On-line November 4, 2008

Summary

Monosodium glutamate (MSG) treatment of neonatal mice results in a selective damage to the arcuate nucleus (ARC) and development of obesity with increased adiposity at sustained body weight in the adulthood. Feeding pattern of the MSG obese mice is unusual. Our previous results showed that after 24-h fasting, MSG mice consumed negligible amount of food in several hours and therefore, it was impossible to register the effect of peptides attenuating food intake such as cholecystokinin (CCK) or cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide. To overcome this problem, two findings were used: firstly, orexigenic effect of neuropeptide Y (NPY) was attenuated both by CCK or CART peptide in lean fed mice and secondly, orexigenic effect of NPY was preserved in fed rats with MSG obesity. In this study, short-term food intake in fed lean and MSG obese C57BL/6 male mice was measured after simultaneous central administration of orexigenic NPY with either CART peptide or peripherally administered CCK. Anorexigenic action of exogenous CART peptide was preserved in MSG obese mice. On the other hand, satiety effect of exogenous CCK was completely lost in MSG obese mice. In conclusion, effective leptin signaling in ARC is necessary for satiety effect of CCK.

Key words

Monosodium glutamate (MSG) obesity • Neuropeptide Y (NPY) • Cholecystokinin (CCK) • Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide

Corresponding author

Dr. Lenka Maletínská, Institute of Organic Chemistry and

Biochemistry, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic. Fax +420 220 183 571. E-mail: maletin@uochb.cas.cz

Introduction

The prevalence of obesity is increasing worldwide, which indicates that the primary cause of obesity lies in environmental and behavioral changes rather than in genetic modifications (for reviews see Coll *et al.* 2007, Cawthorne 2007). Among the environmental influences that disrupt body weight regulation, two factors play a major role: the passive overconsumption of energy-dense, high-fat diets and the decline in physical activity. It is important to emphasize that even a minor imbalance between energy intake and energy expenditure may lead to severe obesity. Obesity is accompanied with a high risk of type 2 diabetes, cholelithiasis, hypertension and coronary heart disease. The scale of the obesity problems and the increasing understanding of the complex systems regulating body weight have led to a renewed effort to identify possible explanation of the mechanisms regulating food intake and to improve the treatment of obesity, metabolic syndrome, and diabetes.

Information on the metabolic status of the organism enters and is processed in the hypothalamus and in the nucleus tractus solitarius (NTS) of the brainstem, which are interconnected reciprocally by hypothalamic neurons projecting to the brainstem (for reviews see Broberger 2005, Broberger and Hokfelt 2001, McMinn *et al.* 2000a).

In the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), adiposity signals leptin and insulin enhance expression and secretion of anorexigenic proopiomelanocortin (POMC) and of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide by one type of neurons and attenuate production of orexigenic neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AgRP) by another neuron type (for reviews see Broberger and Hokfelt 2001, Elmquist *et al.* 1999, King 2005, Coll *et al.* 2007). POMC/CART and NPY/AgRP first order neurons with cell bodies in ARC project to the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), where reduction in energy intake is mediated and to the lateral hypothalamic area (LHA), the “feeding” center of the brain (Broberger 2005, Broberger *et al.* 1999). From PVN and LHA, second order neurons project to the brainstem where gastrointestinal satiety signals such as cholecystikinin (CCK) are processed (McMinn *et al.* 2000a).

NPY is the most powerful regulator of food intake (Lambert *et al.* 1998). However, its orexigenic effect could be eliminated by anorexigenic peptides such as centrally administered CART peptide (Kristensen *et al.* 1998) or peripherally injected CCK (Rowland 1988, McMinn *et al.* 2000b).

Pathogenesis and therapy of obesity are studied using appropriate animal models. Models of monogenic (such as *ob/ob* or *db/db* mice, deficient in leptin or its receptor), chemically induced (such as monosodium glutamate (MSG)-induced obesity) or diet-induced obesity (DIO) were established (for reviews see Butler and Cone 2001, Buettner *et al.* 2007, Casper *et al.* 2008).

MSG obesity results from the treatment of rodents in their first days of life. Specific lesions occur in ARC (Olney 1969) leaving most cells of ARC damaged and those of other hypothalamic nuclei untouched (Eleftheriou *et al.* 2003, Maletínská *et al.* 2006). Subsequent changes show the importance of ARC in the regulation of metabolism. In the MSG-treated animals, ARC area is shrunk, third ventricle widened, and median eminence thinned (Broberger *et al.* 1998). MSG treatment lowers production of growth-hormone releasing hormone (Tamura *et al.* 2002) that results in shortened body length, and atrophy of pituitaries, gonads, and optical nerves. In ARC of MSG-treated rodents, leptin and insulin signaling is impaired (Maletínská *et al.* 2006, Dawson *et al.* 1997) and production of anorexigenic CART peptide and orexigenic NPY is inhibited (Broberger *et al.* 1998, Broberger 1999). Both NPY and CART are produced also in other hypothalamic areas such as PVN and LHA. NPY

immunoreactivity was preserved in the PVN of MSG mice (Broberger *et al.* 1998), probably by local NPY expression (Kerkerian and Pelletier 1986). Besides, CART is expressed in half of cell bodies of nodose ganglion in the vagus nerve which also express CART (Broberger and Hokfelt 2001, Broberger 2005). The extra-ARC sources of NPY and CART are preserved after the MSG treatment.

MSG-treated rodents do not differentiate feeding at light and dark because of their deteriorated retina cells (Edelstein *et al.* 1995, Mistlberger *et al.* 1999), and develop obesity with increased adiposity at sustained body weight (Djazayery *et al.* 1979), which results rather from a lower metabolic rate than from elevated food intake (Morris *et al.* 1998). The possible reason could be a reduced effect of anorexigenic peptides that are produced or processed in ARC. After 24-h fasting, the MSG obese NMRI mice showed substantially attenuated food intake compared with their lean controls which made impossible to follow their response either to peripherally administered satiety hormone cholecystikinin octapeptide (CCK-8) (Maletínská *et al.* 2006) or to centrally injected anorexigenic CART peptide (our preliminary experiments).

Two previous findings inspired us how to overcome this problem: a) in lean fed mice, both CCK and CART peptide inhibited orexigenic effect of NPY (Rowland 1988, Lambert *et al.* 1998, Kristensen *et al.* 1998), and b) the MSG-treated rats had preserved orexigenic effect of NPY (Tang-Christensen *et al.* 1998). In this study, food intake in freely fed MSG obese C57BL/6 mice after parallel administration of orexigenic NPY with either CART peptide or CCK was followed. The aim was to find out whether anorexigenic CART peptide and satiety peptide CCK take part in food intake regulation of mice with MSG obesity and whether functioning ARC is necessary for anorexigenic effect of CCK or CART peptide generally.

Methods

Experimental animals

Male C57BL/6 mice (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23 °C and a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00). They were given *ad libitum* water and standard chow diet that contained 25, 9 and 66 % calories as protein, fat and carbohydrate, with energy of 3.4 kcal/g (ST-1, Velaz, Koleč, Czech Republic). Daily food intake (24-h food intake) was determined regularly

every week from 6 to 16 weeks of age. All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the law of the Czech Republic No. 246/1992.

For MSG obesity, newborn mice were subcutaneously (SC) administered with L-glutamic acid sodium salt hydrate (Sigma, St. Louis, USA) (4 mg/g body weight) daily from postnatal day 2 to 8.

MSG-treated mice aged 16 weeks and their age-related controls were used in feeding experiments. After completing food intake experiments, mice were sacrificed next morning between 8:00 and 9:00 a.m. ($n=20-25$). Serum leptin, and glucose levels were determined. White adipose tissue (subcutaneous, abdominal, gonadal) of all mice were dissected and weighed.

Brain histology

Three controls and three MSG-treated mice (16 week-old) were perfused with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 4 % paraformaldehyde, 0.1 % glutar-aldehyde and 10 % picric acid (w/w). Coronal sections from the whole hypothalamus were collected and lesions in the arcuate nucleus were inspected (Maletínská *et al.* 2006).

Blood serum components

Leptin concentrations in sera were quantified by ELISA assay (BioVendor, Brno, Czech Republic). Serum glucose levels were measured by a glucometer (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan).

Food intake experiments

At the age of 16 weeks, lean or MSG-treated mice were implanted with cannulas (Plastics One, Roanoke, USA) into their third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described earlier (Maletínská *et al.* 2007). Animals were placed into separate cages and allowed at least seven days to recover from surgery with free access to food and water before being used in the experiment.

Peptides

Porcine NPY and cholecystokinin octapeptide (CCK-8, Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) were obtained from NeoMPS (Strasbourg, France). CART(61-102) was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

Feeding test

Between 8:00 and 9:00 a.m., each individual group of 6-8 mice underwent one of the following

treatments: 1) intracerebroventricular (ICV) injection of saline using an infusion pump, 2) ICV injection of NPY at a dose of 5 µg per mouse, 3) ICV injection of CART(61-102) peptide at doses of either 0.1 or 0.5 µg per mouse, 4) ICV co-injection of NPY at a dose of 5 µg plus CART(61-102) peptide at doses of either 0.1 or 0.5 µg per mouse, 5) intraperitoneal (IP) injection of CCK-8 at a dose of either 4 or 40 µg/kg, 6) ICV injection of NPY at a dose of 5 µg per mouse followed 45 min later by IP injection of CCK-8 at a dose of either 4 or 40 µg/kg. All peptides were dissolved in saline. Volume of IP injected solutions was 0.2 ml/mouse; that of ICV injected solutions was 5 µl per mouse. All ICV administered solutions were infused in 20 s and the infusion cannula was left in place for further 20 s to prevent reflux. Each animal was used only once; the experiment was repeated with a new set of mice.

Fifteen min after the ICV injection, mice were given weighed food pellets. Food intake was registered every 30 min and followed for 6 h. Animals had free access to water during the experiment. The results were expressed in grams of food consumed. The placement of cannula was verified histologically after the experiment.

Statistics

Data are presented as means \pm SEM for the number of animals indicated in Figures and Table. They were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). $p<0.05$ was considered statistically significant.

Results

C57BL/6 mice treated in their neonatal period with MSG developed severe obesity at the age of 16 weeks, although their average daily food intake was lower than that of lean untreated controls (3.62 ± 0.23 g vs. 4.07 ± 0.16 g). The ratio of fat weight (subcutaneous, abdominal, plus epididymal) to body weight was about eight times enhanced and leptin level was very substantially increased in MSG-treated mice compared with lean controls. On the other hand, glucose level of the MSG-treated mice did not differ from that of lean controls (Table 1). Analysis of serial coronal sections of the hypothalamus showed an obvious disappearance of neurons in ARC of MSG-treated mice (Fig. 1) while adjacent hypothalamic nuclei did not show any sign of damage similarly as in our previous study with NMRI mice (Maletínská *et al.* 2006).

Table 1. Metabolic parameters of freely fed 16-week-old lean and MSG male C57BL/6 mice.

Characterization	Ratio of fat/body weight	Glucose (mmol/l)	Leptin (ng/ml)
Control	1.41 ± 0.41	8.20 ± 0.64	7.00 ± 1.21
MSG	13.48 ± 0.99 ***	7.88 ± 0.62	45.55 ± 6.54 ***

All values are expressed as the mean ± SEM (n=20-25). Significant difference: ***p<0.001 vs. controls.

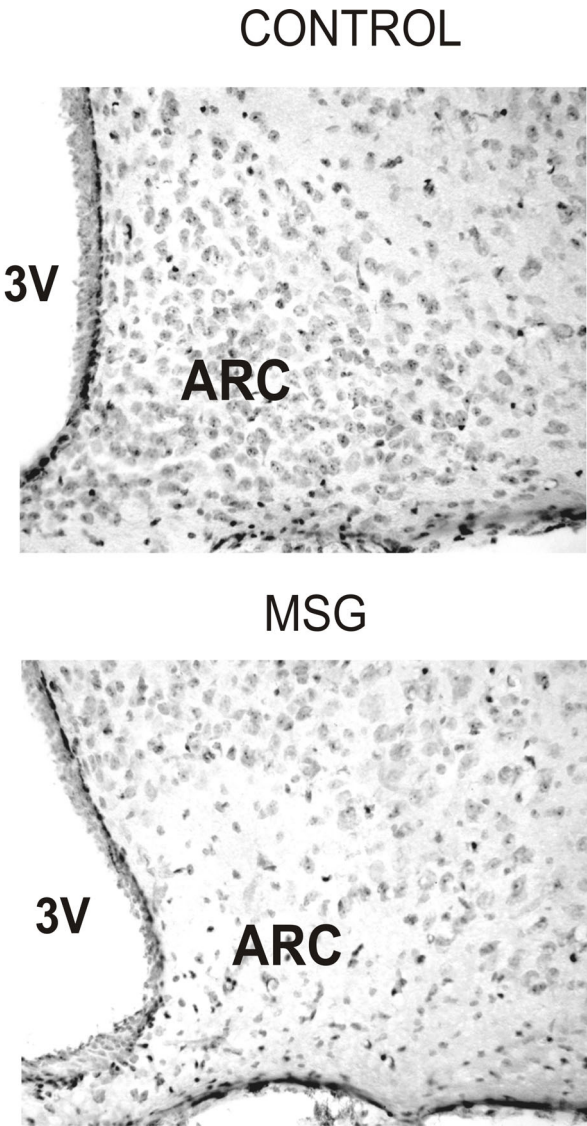


Fig. 1. MSG lesions in hypothalamic arcuate nucleus (ARC). Coronal sections of the hypothalamus of MSG-treated mice stained with 0.1 % cresyl violet acetate show disappearance of neurons in ARC compared with control mice (3V – third ventricle) (n=3 per group).

To determine whether NPY pretreatment attenuates the feeding response to CCK, mice received 5 µg ICV of NPY, followed 45 min later (at a time of the first food intake measurement) by IP injection of CCK, similarly as in the study of McMinn *et al.* (2000b). In

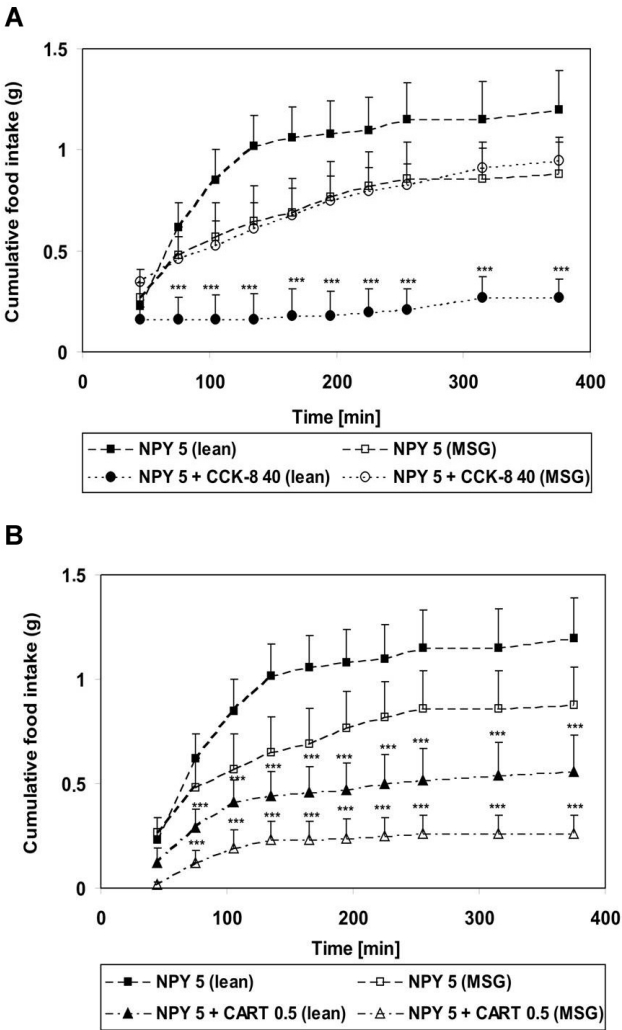


Fig. 2. A. Cumulative food intake response of freely fed lean and MSG mice to NPY at a dose of 5 µg/mouse and NPY at a dose of 5 µg/mouse plus CCK-8 (dose 40 µg/kg). **B.** Cumulative food intake response of freely fed lean and MSG mice to NPY at a dose of 5 µg/mouse and NPY (5 µg/mouse) plus CART(61-102) at a dose of 0.5 µg/kg. Food intake is expressed in grams of food consumed (n=6-8 mice per group). *** p<0.001 vs. respective group treated by NPY at a dose of 5 µg/mouse.

lean controls, orexigenic action of NPY was completely abolished by CCK-8, which acted in a dose-dependent way (Figs 2a and 3); similarly, it was lowered by co-administration of CART peptide also in a dose-dependent way (Figs 2b and 3). In MSG obese mice, CCK-8 did not

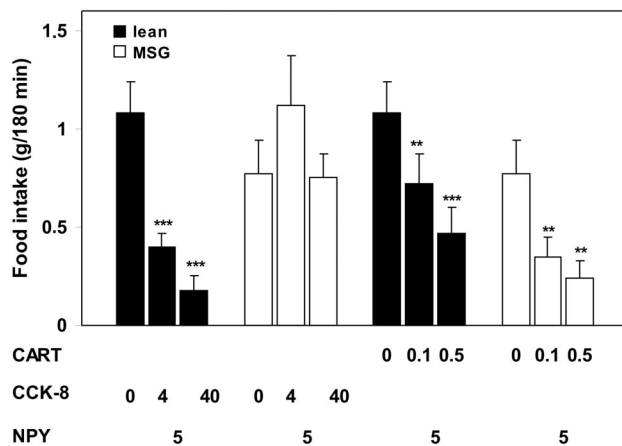


Fig. 3. Inhibition of NPY-induced food intake (dose 5 µg/mouse) by CART(61-102) (0.1 and 0.5 µg/mouse) or CCK-8 (4 and 40 µg/kg), 195 min after administration of NPY in lean and MSG mice. Food intake is expressed in grams of food consumed per 180 min (n=6-8 mice per group). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. respective group treated by NPY at a dose of 5 µg/mouse.

affect orexigenic effect of NPY at all; CART peptide attenuated the NPY induced feeding to a lower extent than in lean controls (Figs 2a, 2b and 3).

Discussion

NPY exerts its effects on food intake at the level of the PVN and LHA which receive a dense projection from the arcuate nucleus and where NPY Y1 receptors are expressed (Broberger and Hokfelt 2001). MSG treatment of neonatal rodents cut virtually all projections from ARC, but disabled neither the orexigenic effect of exogenous NPY nor the anorexigenic effect of exogenous CART peptide in the MSG obese C57BL/6 mice (Figs 2a and 2b). In this study, exogenous CART peptide attenuated orexigenic effect of NPY most probably through specific binding sites for CART peptide (Maletínská *et al.* 2007) that are located outside ARC. Until now, molecular character of CART peptide receptors has not been elucidated. It is possible that in MSG obese mice, exogenous NPY and CART peptide can act through PVN or LHA *via* their intact neurons and preserved neuronal circuits.

Anorexigenic effect of CCK is mediated by CCK-A receptors that are located both in central nervous system and periphery. CCK produces satiety in two

different brain areas: in nucleus tractus solitarius (NTS) of the brainstem and in medial-basal hypothalamus (Luckman and Lawrence 2003, Cummings and Overduin 2007). Although none of these areas was damaged by the MSG treatment, CCK-8 did not affect NPY-induced feeding in MSG obese mice in this study which was in accordance with our previous results using NMRI mice (Maletínská *et al.* 2006). It was shown previously that MSG obese rodents responded neither to systemic nor to central leptin administration (Dawson *et al.* 1997, Tang-Christensen *et al.* 1999) similarly as did Koletsy obese *fa^k/fa^k* rats (Takaya *et al.* 1996, Morton *et al.* 2003) or obese *db/db* mice (Morton *et al.* 2003), from a common reason – lack of functional leptin receptors, which was restricted to ARC in the MSG obese rodents or was total in Koletsy rats or *db/db* mice. Interestingly, both MSG obese mice and rodents with impaired leptin receptor did not provide satiety response to CCK (Morton *et al.* 2005, Maletínská *et al.* 2006). After leptin signaling had been restored in ARC of Koletsy rats using ARC directed injection of human *lepr^b* adenovirus, effect of CCK on the activation of neurons of NTS and area postrema, where satiety-related inputs are processed, was reconstituted (Morton *et al.* 2005). It shows that ARC-based leptin receptors are necessary for CCK-induced satiety and explains irresponsiveness to CCK-8 in MSG obese mice.

In MSG obese mice, CART peptide production in their damaged ARC is disabled, but anorexigenic action of exogenous CART peptide is preserved. On the other hand, CCK production is untouched in MSG obese mice, but CCK satiety effect is lost; possibly due to a non-functional leptin signaling in the ARC, which is crucial for mediating satiety response to CCK.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 and 305/06/0427 (GA CR) and Z4 055 0506 (Academy of Sciences CR). We are indebted to A. Vytejšková and H. Vysušilová for excellent technical assistance, and to Dr. Z. Pirník and Dr. A. Kiss (Institute of Experimental Endocrinology, Bratislava) for brain histology.

References

- BROBERGER C: Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* **848**: 101-113, 1999.
- BROBERGER C: Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* **258**: 301-327, 2005.
- BROBERGER C, JOHANSEN J, JOHANSSON C, SCHALLING M, HOKFELT T: The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15043-15048, 1998.
- BROBERGER C, VISSER TJ, KUCHAR MJ, HOKFELT T: Neuropeptide Y innervation and neuropeptide-Y-Y1-receptor-expressing neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of the mouse. *Neuroendocrinology* **70**: 295-305, 1999.
- BROBERGER C, HOKFELT T: Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol Behav* **74**: 669-682, 2001.
- BUETTNER R, SCHOLMERICH J, BOLLHEIMER LC: High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* **15**: 798-808, 2007.
- BUTLER AA, CONE RD: Knockout models resulting in the development of obesity. *Trends Genet* **17**: S50-S54, 2001.
- CASPER R, SULLIVAN EL, TECOTT L: Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology* **199**: 313-329, 2008.
- CAWTHORNE MA: Opportunities and challenges for the development of pharmacological therapies for obesity treatment. *Obes Rev* **8** (Suppl 1): 131-136, 2007.
- COLL AP, FAROOQI S, O'RAHILLY SO: The hormonal control of food intake. *Cell* **129**: 251-262, 2007.
- CUMMINGS DE, OVERDUIN J: Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* **117**: 13-23, 2007.
- DAWSON R, PELLEYMOUNTER MA, MILLARD WJ, LIU S, EPPLER B: Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol* **273**: E202-E206, 1997.
- DJAZAYERY A, MILLER DS, STOCK MJ: Energy balances in obese mice. *Nutr Metab* **23**: 357-367, 1979.
- EDELSTEIN K, PFAUS JG, RUSAK B, AMIR S: Neonatal monosodium glutamate treatment prevents effects of constant light on circadian temperature rhythms of adult rats. *Brain Res* **675**: 135-142, 1995.
- ELEFTERIOU F, TAKEDA S, LIU X, ARMSTRONG D, KARSENTY G: Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinology* **144**: 3842-3847, 2003.
- ELMQUIST JK, ELIAS CF, SAPER CB: From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **22**: 221-232, 1999.
- KERKÉRIAN L, PELLETIER G: Effects of monosodium L-glutamate administration on neuropeptide Y-containing neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res* **369**: 388-390, 1986.
- KING PJ: The hypothalamus and obesity. *Curr Drug Targets* **6**: 225-240, 2005.
- KRISTENSEN P, JUDGE ME, THIM L, RIBEL U, CHRISTIANSEN KN, WULFF BS, CLAUSEN JT, JENSEN PB, MADSEN OD, VRANG N, LARSEN PJ, HASTRUP S: Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**: 72-76, 1998.
- LAMBERT PD, COUCEYRO PR, MC GIRR KM, DALL VECCHIA SE, SMITH Y, KUCHAR MJ: CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* **29**: 293-298, 1998.
- LUCKMAN SM, LAWRENCE CB: Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *Trends Endocrinol Metab* **14**: 60-65, 2003.
- MALETÍNSKÁ L, SHAMAS TOMA R, PIRNIK Z, KISS A, SLANINOVÁ J, HALUZÍK M, ŽELEZNÁ B: Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. *Reg Peptides* **136**: 58-63, 2006.
- MALETÍNSKÁ L, MAIXNEROVÁ J, MATYŠKOVÁ R, HAUGVICOVÁ R, ŠLONCOVÁ E, ELBERT T, SLANINOVÁ J, ŽELEZNÁ B: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* **559**: 109-104, 2007.
- MCMINN JE, BASKIN DG, SCHWARTZ MW: Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obesity Rev* **1**: 37-46, 2000a.

- McMINN JE, SINDELAR DK, HAVEL PJ, SCHWARTZ MW: Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin. *Endocrinology* **141**: 4442-4448, 2000b.
- MISTLBERGER RE, ANTHER MC: Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res* **842**: 73-83, 1999.
- MORRIS MJ, TORTELLI CF, FILIPPIS A, PROIETTO J: Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Reg Peptides* **75-76**: 441-447, 1998.
- MORTON GJ, NISWENDER KD, RHODES CJ, MYERS Jr MG, BLEVINS JE, BASKIN DG, SCHWARTZ MW: Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa^k/fa^k) rats. *Endocrinology* **144**: 2016-2024, 2003.
- MORTON GJ, BLEVINS JE, WILLIAMS DL, NISWENDER KD, GELLING RW, RHODES CJ, BASKIN DG, SCHWARTZ MW: Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J Clin Invest* **115**: 703-710, 2005.
- OLNEY JW: Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**: 719-721, 1969.
- ROWLAND NE: Peripheral and central satiety factors in neuropeptide Y-induced feeding in rats. *Peptides* **9**: 989-992, 1988.
- TAKAYA K, OGAWA Y, HIRAOKA J, HOSODA K, YAMORI Y, NAKAO K, KOLETSKY RJ: Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nat Genet* **14**: 130-131, 1996.
- TAMURA H, KAMEGAI J, SHIMIZU T, ISHII S, SUGIHARA H, OIKAWA S: Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology* **143**: 3268-3275, 2002.
- TANG-CHRISTENSEN M, VRANG N, LARSEN PJ: Glucagon-like peptide 1(7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment. *Diabetes* **47**: 530-537, 1998.
- TANG-CHRISTENSEN M, HOLST JJ, HARTMANN B, VRANG N: The arcuate nucleus is pivotal in mediating the anorectic effects of centrally administered leptin. *Neuroreport* **10**: 1183-1187, 1999.
-

Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor

Jana Maixnerová^a, Andrea Špolcová^a, Miroslava Pýchová^a, Miroslava Blechová^a,
Tomáš Elbert^a, Martina Řezáčová^b, Blanka Železná^a and Lenka Maletínská^a

^aInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague and ^bFaculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic.

Corresponding author:

Lenka Maletínská

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

Academy of Sciences of the Czech Republic

Flemingovo nám. 2

166 10 Praha 6

Czech Republic

maletin@uochb.cas.cz

Tel.: +420 220183525

Fax: +420 220183571

ABSTRACT

The recently discovered prolactin-releasing peptide (PrRP) binds to the PrRP receptor both in the central nervous system and the periphery and is involved in endocrine regulation and energy metabolism. However, its main physiological role is currently unknown. Two biologically active isoforms of PrRP exist: the 31 (PrRP31) and the 20 (PrRP20) amino acid forms, which both contain a C-terminal Phe amide sequence.

In the present study, the PrRP receptor was immunodetected in three rodent tumor pituitary cell lines: rat GH3 cells containing somatotrophs and lactotrophs, mouse AtT20 cells containing adenocorticotrophs, and rat RC-4B/C cells containing somatotrophs, lactotrophs, thyrotrophs, adenocorticotrophs and gonadotrophs. The saturation binding of radioiodinated PrRP31 to intact cells demonstrated a K_d in the 10^{-9} M range and a B_{max} in the range of tens of thousands binding sites per cell.

For binding to RC-4B/C cells, both PrRP31 and PrRP20 competed with ^{125}I -PrRP31 with a similar K_i . The C-terminal analog PrRP13 showed lower binding potency compared to PrRP31 and PrRP20.

All PrRP analogs increased the phosphorylation of MAPK/ERK1/2 (mitogen-activated phosphorylase/extracellular-regulated kinase) and CREB (cAMP response element-binding protein) in RC-4B/C cells. Additionally, prolactin release was induced by the PrRP analogues in a dose-dependent manner in RC-4B/C cells.

Studies on pituitary cell lines expressing the PrRP receptor are more physiologically relevant than those on cells transfected with the receptor. RC-4B/C cell line can be used as a model system for pharmacological studies searching for PrRP antagonists and stable effective PrRP agonists, as these drugs may have potential as anti-obesity agents.

Key words: PrRP; Pituitary cell lines; Binding; MAPK/ERK1/2; CREB; PRL

1. Introduction

Prolactin-releasing peptide (PrRP) was identified as an endogenous ligand of the orphan human G-protein-coupled receptor GPR10 (also hGR3, rat UHR-1) by reverse pharmacology (Hinuma et al., 1998). The name reflects the fact that PrRP was found to stimulate the secretion of prolactin (PRL) in primary pituitary cells from lactating rats, the rat cell line RC-4B/C (Hinuma et al., 1998) and *in vivo* in rats (Matsumoto et al., 1999). PrRP-mediated PRL secretion was later questioned and is not currently considered to be the primary function of PrRP (Taylor and Samson, 2001).

On the other hand, growing evidence points to PrRP involvement in the control of food intake and body weight (Lawrence et al., 2000). Centrally administered PrRP was shown to inhibit food intake and body weight gain in rats and mice (Bechtold and Luckman, 2006; Lawrence et al., 2002). Furthermore, both PrRP receptor- and PrRP-deficient mice displayed late-onset obesity (Bjursell et al., 2007; Takayanagi et al., 2008).

PrRP is also implicated in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, blood pressure and nociception (for reviews, see Onaka et al., 2010; Sun et al., 2005).

PrRP belongs to a family of RF-amide peptides containing an Arg-Phe-amide motif in their C-terminus (Fukusumi et al., 2006; Onaka et al., 2010; Sun et al., 2005). It has two molecular isoforms of either 31 (PrRP31) or 20 (PrRP20) amino acids with an identical C-terminal sequence and equipotent biological activity (Roland et al., 1999). The C-terminal 13-peptide of PrRP31 preserves full biological potency to PrRP31 *in vitro* (Boyle et al., 2005). The C-terminal PrRP(25-31) heptapeptide was found to be the minimal active agonist structure (Beck et al., 2004; Boyle et al., 2005;

Roland et al., 1999), and the C-terminal Phe amide is of critical importance for biological activity (Hinuma et al., 1998).

PrRP is mostly expressed in the medulla oblongata, brainstem and hypothalamus (Fujii et al., 1999; Ibata et al., 2000; Roland et al., 1999). The PrRP receptor has been shown to be localized in the thalamus, hypothalamus, nucleus tractus solitarius, anterior pituitary and the adrenal medulla (Abe et al., 2003; Roland et al., 1999).

The current understanding of the functional binding of PrRP to its receptor is limited, mainly because PrRP antagonists have not been found and functional tests of PrRP analogues are scarce. PrRP-specific binding has been determined only in cells transfected with the PrRP receptor (Boyle et al., 2005; Hinuma et al., 1998; Langmead et al., 2000; Roland et al., 1999) or in isolated cell membranes (Sato et al., 2000).

Kimura et al. (2000) showed that PrRP activated extracellular signal-regulated protein kinase (MAPK/ERK1/2) in GH3 cells, while Hayakawa et al. (2002) suggested that PrRP activated a PI3K-protein kinase B/Akt to induce the PRL promoter *via* a CREB (cAMP response element-binding protein)-dependent mechanism.

The present study describes the binding and function of three PrRP analogs in three rodent pituitary cell lines that express the PrRP receptor. Studies of PrRP in physiologically relevant cell lines can better elucidate the role of PrRP in the organism.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Na¹²⁵I was from MP Biomedicals (Illkirch, France) and IODO-GENTM from Pierce (Rockford, IL, USA).

2.2. Peptides

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and corticotrophin-releasing hormone (CRH) was from NeoMPS (Strasbourg, France). PrRP peptides were synthesized at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, by solid-phase synthesis using the Fmoc strategy on the ABI433A synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by Maixnerová et al. (2007). The following peptides were synthesized:

PrRP31 (SRAHQHSMETRTDPINPAWYTGRGIRPVGRF-NH₂), PrRP20 (TPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH₂) and PrRP13 (WYTGRGIRPVGRF-NH₂). PrRP31 was iodinated at Tyr²⁰ either with Na¹²⁵I or non-radioactive NaI using IODO-GENTM under the mild conditions described for tryptophan containing peptides (Elbert et al., 2010). The purification was accomplished on Agilent Prep-C18 5μ, 250x4.6 mm column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); gradient elution from 10% B to 20% B in 5 min and then to 30% B in 60 min (A = water with 0.1% TFA, B = acetonitrile with 0.1% of TFA). The molecular weights of the non-radioactive iodinated peptides were determined by MALDI-TOF Reflex IV mass spectrometry (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). The specific activity of ¹²⁵I-PrRP31 was about 2000 Ci/mmol. The radiolabeled peptide was kept in aliquots at -20°C and used for binding studies within 1 month.

2.3. Cell culture

Three pituitary cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). RC-4B/C cells (Hurbain-Kosmath et al., 1990) were grown in DMEM medium, pH 7.4, supplemented with 10% fetal bovine serum and 2.5 ng/ml epidermal growth factor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). AtT20 cells (BUONASSISI et al., 1962) were grown in DMEM medium, pH 7.4, supplemented with 10% horse serum. GH3 cells (Tashjian et al., 1968) were grown in HAMS F-10 medium, pH 7.4, supplemented with 15% horse serum and 2.5% fetal bovine serum. To all media, L-glutamine was added to a final concentration of 2 mM, and streptomycin/penicillin was added to a concentration of 1% (all media and reagents were from PAA, Cölbe, Germany). All cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air/5% CO₂. Medium was changed every 2-3 days and cells were subcultured as required.

2.4. Detection of PrRP receptor by Western blotting

Cell lines RC-4B/C, GH3, and AtT20 were maintained in 75 cm² flasks for 7 days, and the medium was changed every 2 days. Cells were washed three times with washing buffer (10 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂) and then lysed in lysis buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% glycerol, 0.01% (w/v) bromphenol blue, 5% β-mercaptoethanol). The lysates were centrifuged at 2000 x g/min for 10 minutes. Protein content in the supernatant was then determined by the Bradford assay (Bradford, 1976). Aliquots of the cell lysates were stored at -20°C.

For Western blotting, equal numbers of cells were subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE gels, and separated proteins were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membrane (0.45 µm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As a positive control, lysates of Jurkat cells were used (a gift from L. Sedláčková, Third Faculty of medicine, Charles University, Prague). After blocking with 5% non-fat milk, the

membrane was incubated with rabbit polyclonal anti-GPR10 antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, 1:1000) at room temperature for 1 h. Anti-rabbit IgG goat peroxidase-conjugated antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA, 1:20000) was applied to the membrane for 1 h at room temperature. The membrane was developed with SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's instructions and detected with a CCD camera Las-3000 (Fujifilm life science, USA). The relative density of immunostained bands was quantified using Quantity One software version 4.6.1. (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.5. Binding to intact plated cells

For binding studies, cells were seeded on polyethylene imine (PEI)-coated 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark). To reach the density about of 4×10^5 cells/well, which was found to be optimal for binding experiments, cells were allowed to grow for 3 days.

Saturation and competition binding experiments were performed according to Motulsky and Neubig (2002). Plated cells were incubated with 0.5–6 nM ^{125}I -PrRP31 in saturation experiments or with 0.1 nM ^{125}I -PrRP31 and 10^{-11} – 10^{-5} M non-radioactive ligand in competitive binding experiments. Experiments were performed in a total volume of 0.25 ml of binding buffer (20 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl_2 , 5.5 mM glucose, 1 mg/ml BSA and 0.1 mg/ml basic pancreatic trypsin inhibitor) for 60 min at 25 °C. Nonspecific binding was determined using PrRP31 at a concentration of 10^{-5} M. After incubation, cells were washed with washing buffer and then solubilized in 0.1 M NaOH. Bound radioactivity was determined by γ -counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Non-specific binding amounted to less than 15% of the total binding. Experiments were carried out in duplicate at least three times.

2.6. Detection of MAPK/ERK1/2 and CREB phosphorylation by Western blotting

Cell lines RC-4B/C, GH3, and AtT20 were plated on PEI-coated 6-well plates (IWAKI, Lennox Lab Supplies, Dublin, Ireland) at 8×10^5 cells/well and grown in complete medium for 2 days. Then, 20 h before an experiment, the medium was exchanged for the appropriate serum-free medium. The next day, the cells were incubated with 10^{-5} M PrRP31, PrRP20 or PrRP13, or 10^{-5} M PMA, which was used as a positive control, for 5 or 30 min at 37°C. The cells were then washed three times with cold phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) and lysed for 5 min in lysis buffer (see 3.3, with 5 mM orthovanadate and 50 mM NaF) on ice. Aliquots of the cell lysates were stored at -20°C. For Western blotting, lysates of equal numbers of cells were subjected to electrophoresis using 12% SDS-PAGE gels. For protein transfer, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was used (Sigma, St. Louis, USA). After blocking with 5% non-fat milk supplemented with 5mM sodium orthovanadate and 50mM NaF, the membrane was incubated with the appropriate primary antibody (Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) mouse mAb, diluted 1:2000, or p44/42 MAPK mouse mAb, diluted 1:2000; phospho-CREB (Ser133) mouse mAb or CREB mouse mAb, diluted 1:2000; all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) at room temperature for 1 h. Anti-mouse IgG rabbit peroxidase-conjugated antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA, 1:12000) was applied at room temperature for 1 h. The membranes were then developed as described in 3.3.

2.7. Determination of pituitary hormone release in medium

RC-4B/C, GH3 and AtT20 cells were plated on PEI-coated 24-well plates to reach a cell density of about 5×10^5 cells/well in 3 days. The medium of GH3 and RC-4B/C was exchanged for the appropriate serum-free medium 2 h before the experiment

with the exception of AtT20 cells for which the medium was exchanged 20 h before the experiment. GH3 and RC-4B/C cells were incubated with TRH at a final concentration of 10^{-5} M or a PrRP analogue at a final concentration of 10^{-10} – 10^{-5} M for 1 h at 37°C. AtT20 cells were incubated with CRH or PrRP31 at a final concentration of 10^{-5} M for 3 h at 37°C. The medium was then collected, centrifuged at 2000 x g for 5 min, and stored in aliquots at -20°C. Pituitary hormones GH, PRL, ACTH, luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and thyroid-stimulating hormone (TSH) were measured in a diluted medium using the MILLIPLEX™ MAP Rat pituitary kit assay (Millipore, St. Charles MO, USA) according to the manufacturers' recommended protocol. Prolactin in the medium from RC-4B/C cells was determined with an RIA assay kit (Izotop, Budapest, Hungary) according to the manufacturers' recommended protocol.

2.8. Analysis of binding data and statistics

Data are presented as means \pm S.E.M. Saturation and competitive binding curves were plotted using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA), comparing the best fit for single binding site models (K_d , B_{max} and IC_{50} values were obtained from non-linear regression analysis). Inhibition constants (K_i) were calculated from IC_{50} values using the Cheng–Prusoff equation (Chang and Cheng, 1978; Tashjian et al., 1968).

Data from cell signaling and hormone release experiments were analyzed by one-way ANOVA (analysis of variance) followed by Tukey's post hoc test using Graph-Pad Software; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Detection of GPR10 receptor by Western blotting

The presence of the GPR10 receptor in the GH3, RC-4B/C, and AtT20 cell lines was verified by Western blotting. Antibody against the rat PrRP receptor GPR10 recognized a band of 41 kDa in all three cell lines similar to that in Jurkat cell lysates, which were used as a positive control (see Fig.1).

3.2. Optimization of binding experiments

In GH3, RC-4B/C, and AtT20 cells, the specific binding of ^{125}I -PrRP31 at 25°C was linear from 1.5 to 5×10^5 cells/well. It reached a maximum at 45 min and remained constant for at least the next 60 min. The specific binding at 4°C reached the maximum at 90 min and was constant for 2 hours of incubation; the non-specific binding at this temperature, however, amounted to 40% of the total binding. The specific binding at 37°C was constant from 20 to 45 min of incubation, but the non-specific binding was higher than 50%, most likely due to peptide degradation. The presence of EDTA, EGTA, or Ca^{2+} in the binding buffer did not affect specific binding (results not shown).

After optimization of binding conditions, a 60 min incubation at 25°C with 4×10^5 cells/well (plated intact cells) was routinely used.

3.3. Saturation binding of ^{125}I -PrRP31 to GH3, RC-4B/C and AtT20 cells

The saturable specific binding of ^{125}I -PrRP31 to GH3 cells gave a K_d of 5.72 ± 1.08 nM and a B_{max} of $88,300 \pm 12,100$ binding sites/cell. The non-specific binding was lower than 11%. Non-linear regression analysis indicated the presence of one binding site (see Fig. 2a). The saturable specific binding of ^{125}I -PrRP31 to RC-4B/C cells gave a K_d of 4.21 ± 0.66 nM and a B_{max} of $67,400 \pm 14,500$ binding sites/cell. The non-specific binding was less than 7%. Non-linear regression analysis indicated

the presence of one binding site (see Fig. 2b). The specific binding of ^{125}I - PrRP31 to AtT20 cells was saturable, with non-specific binding less than 22%, a K_d of 3.97 ± 1.38 nM and a B_{max} of $22,800 \pm 1,100$ binding sites/cell (Fig. 2c).

3.4. Competitive binding of PrRP to RC-4B/C cells

PrRP31, PrRP20 and I-PrRP31 competed with ^{125}I -PrRP31 for binding to RC-4B/C cells with a K_i in the nM range, as summarized in Table 1. PrRP13 had a K_i in the 10^{-7} M range (Table 1).

3.5. PrRP effect on MAPK/ERK1/2 and CREB phosphorylation

To examine the effect of PrRP analogs on cell signaling, MAPK/ERK1/2 phosphorylation and CREB phosphorylation were determined in RC-4B/C cells. Five-minute incubations resulted in a significant increase in phosphorylated protein and a lower background compared to 30-min incubations (results not shown). Therefore 5-min incubations were routinely used. PMA was used as a positive control both for the phosphorylation of MAPK/ERK1/2 (Nanzer et al., 2004) and CREB (Ji et al., 1996).

PrRP31, PrRP20, and PrRP13 stimulated phosphorylation of both MAPK/ERK1/2 and CREB, however, with different potencies, as shown in Fig. 3. PrRP31 and PrRP20 increased phosphorylation of both MAPK/ERK1/2 and CREB significantly. PrRP13 increased phosphorylation of CREB significantly but did not increase phosphorylation of MAPK/ERK1/2 significantly.

3.6. Effect of PrRP on the release of pituitary hormone in vitro

The ability of PrRP analogs to stimulate the release of pituitary hormones from three pituitary cell lines was tested using the MILLIPLEX rat pituitary kit assay. Serum-starved pituitary cells were stimulated for 1-3 h at 37°C with PrRP31 or standards (TRH for prolactin release in GH3 cells and CRH for ACTH release in AtT20 cells), and secreted hormones were measured. From all pituitary cells and

hormones tested (GH3 cells for GH and PRL release, AtT20 cells for ACTH release and RC-4B/C cells for all anterior pituitary hormones release), only PRL from RC-4B/C was robustly secreted after 1 and 3 h of PrRP31 stimulation (results not shown).

In RC-4B/C cells, RIA was used for quantification of the PRL release after stimulation of cells at various concentrations of PrRP31, PrRP20 and PrRP13 (see Fig. 4). The EC_{50} values determined by non-linear regression analysis were as follows: $(5.90 \pm 1.43) \times 10^{-9}$ M for PrRP31, $(6.52 \pm 1.10) \times 10^{-9}$ M for PrRP20 and $(1.51 \pm 1.35) \times 10^{-8}$ M for PrRP13.

4. Discussion

Prolactin-releasing peptide, originally associated with a role in prolactin release, is now considered to have other important physiological functions in mammalian organisms. These include the secretion of other hormones, the inhibition of food intake and the increase of energy expenditure.

While the absence of a PrRP antagonist hinders the identification of the physiological role of PrRP, and data concerning the functional binding of PrRP analogues are scarce (Boyle et al., 2005; Roland et al., 1999), we decided to perform this study with PrRP receptor-expressing cells, which are the best system for PrRP functional binding studies.

In our study, the binding and functional characterization of two naturally occurring PrRP analogues (PrRP31 and PrRP20, and C-terminal fragment PrRP13) were determined in three rodent pituitary cell lines: mouse AtT20 adenocorticotrophs, rat GH3 cells containing somatotrophs and lactotrophs, and rat RC-4B/C cells containing somatotrophs, lactotrophs, adenocorticotrophs and gonadotrophs. In all three lines, we demonstrated the presence of the PrRP receptor by immunodetection on Western blots.

In cells with transfected GPR10 (Hinuma et al., 1998; Roland et al., 1999) or UHR-1 (Hinuma et al., 1998; Langmead et al., 2000), the specific binding of ^{125}I -PrRP31 was characterized with K_d s in the pM and nM ranges. Rat membranes from the hypothalamus and pituitary specifically bound ^{125}I -PrRP31 with a K_d in the nM range (Sato et al., 2000). In this study, in all pituitary cell lines that endogenously express the PrRP receptor, the K_d was in the nM range, which is typical for receptors and their endogenous ligands (Motulsky and Neubig, 2002). All three pituitary cell lines showed a quite high but reasonable (Motulsky and Neubig, 2002) B_{max} in the tens of

thousands of binding sites per cell, which made them suitable for further competitive binding and functional studies.

The binding potency of the three PrRP analogs was compared using competitive binding assays in RC-4B/C cells. PrRP31 and PrRP20 showed equipotent binding affinity to RC-4B/C cells with a K_i in the nM range, similar to that described in the literature (Roland et al., 1999). On the other hand, PrRP13 was able to displace ^{125}I -PrRP binding with a K_i of only two orders of magnitude lower. Finally, displacement of ^{125}I -PrRP binding by I-PrRP proved that [^{125}I]-radiolabeling did not change the pharmacological properties of PrRP.

The PrRP receptor was first reported to be involved in the release of prolactin but not other hormones from rat pituitary cells, both primary and RC-4B/C, with a similar potency as TRH (Hinuma et al., 1998). However, later studies demonstrated that PrRP was less active than TRH or vasoactive intestinal peptide (VIP) in both pituitary cell aggregates and *in vivo* (Rubinek et al., 2001; Watanobe et al., 2000). The potency of PrRP to release PRL was questioned because of the fact that in the median eminence, where classical hypophysiotropic hormones are released to the portal blood, PrRP immunoreactive fibers were not detected (Jarry et al., 2000; Maruyama et al., 1999). Moreover, PrRP was found only to increase PRL in response to TRH (Spuch et al., 2007) but not to directly affect prolactin secretion in rat primary pituitary cells (Samson et al., 1998) or *in vivo* (Jarry et al., 2000). Therefore, it was suggested that PRL release was not a primary function of PrRP (Taylor and Samson, 2001). On the other hand, in human prolactin-secreting pituitary adenomas, PrRP was linked to GH secretion but not to PRL release (Rubinek et al., 2001). In rats, centrally injected PrRP was also found to cause the release of GH, LH, and ACTH

via modulatory action on hypothalamic hypophysiotropic neurons (Iijima et al., 2001; Seal et al., 2000).

Due to the contradictory reports on the effects of PrRP on hormone secretion in the pituitary, we screened all hormones that could be induced by PrRP31 in three pituitary cell lines by MILLIPLEX rat pituitary panels. Of all three lines used, the only robust and significant response to PrRP31 was PRL release from rat RC-4B/C cells, in agreement with the effect described in the original study by Hinuma (Hinuma et al., 1998).

RIAs indicated that all three PrRP analogs stimulated prolactin release from RC-4B/C cells with comparable potency in a dose-dependent manner and with an EC₅₀ in the 10⁻⁹ to 10⁻⁸ M range.

A downstream effect of neurotransmitters involved in the regulation of energy metabolism acting on G-protein coupled receptor (such as PrRP) usually involves MAPK/ERK1/2 activation preceding CREB-mediated gene transcription (Berthoud et al., 2006). PrRP was shown to stimulate both MAPK/ERK1/2 (Kimura et al., 2000) and CREB (Hayakawa et al., 2002) phosphorylation in GH3 cells in order to elicit PRL promoter activity in GH3 cells. In our study, we found an equal potency of PrRP31, 20 and 13 to activate both MAPK/ERK1/2 (in the cytosol) and CREB signaling (nuclear) and to stimulate PRL release in RC-4B/C cells. Thus, CREB may play a role in the signaling via MAPK/ERK1/2 in the action of PrRP in lactotrophs.

In conclusion, three rodent pituitary tumor-derived cell lines were shown to possess high levels of the PrRP receptor, both by immunodetection and saturation specific binding with K_Ds in the nM range. The rat RC-4B/C cell line was especially universal in binding and functional studies with the PrRP analogs. PrRP31 and PrRP20 were equipotent in binding to these cells, while PrRP13 showed lower binding potency.

However, all three PrRP analogs stimulated prolactin release and MAPK/ERK1/2 and CREB signaling very effectively and with comparable potency.

Our study demonstrates that cell lines endogenously expressing the PrRP receptor can serve as relevant physiological models that are a compromise between recombinant cell lines and primary cell preparations. These lines may be useful for elucidating the functions of PrRP.

Acknowledgements

This study was supported by Grant Agency of the Czech Republic No. P303/10/1368 and Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

We gratefully acknowledge the generous help of M. Šanda for providing the mass spectra and J. Jahodová and R. Pavlovičová from the First Faculty of Medicine, Charles University, Prague for pituitary hormone measurement by MILLIPLEX.

References:

- Abe, T., Koga, N., Tomita, M., Tonoike, T., Kushima, M., Takahashi, K., Sano, Y., Taniyama, M., 2003. Cellular localization of prolactin-releasing peptide receptors in the human pituitary. *Acta Neuropathol* 106, 495-500.
- Bechtold, D., Luckman, S., 2006. Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice. *Endocrinology* 147, 4723-4729.
- Beck, B., Max, J., Richy, S., Stricker-Krongrad, A., 2004. Feeding response to a potent prolactin-releasing peptide agonist in lean and obese Zucker rats. *Brain Res* 1016, 135-138.

Berthoud, H., Sutton, G., Townsend, R., Patterson, L., Zheng, H., 2006. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav* 89, 517-524.

Bjursell, M., Lennerås, M., Göransson, M., Elmgren, A., Bohlooly-Y, M., 2007. GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 633-638.

Boyle, R., Downham, R., Ganguly, T., Humphries, J., Smith, J., Travers, S., 2005. Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide. *J Pept Sci* 11, 161-165.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Buonassisi, V., Sato, G., Cohen, A., 1962. Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 1184-1190.

Chang, C., Cheng, Y., 1978. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources. *Biochem Pharmacol* 27, 2297-2300.

Elbert, T., Vesela, I., 2010. Conditions for successful labeling of oxidation sensitive peptides by Na[¹²⁵I] – IODO-GENTM system. *J Label Compd Radiopharm* 53, 288-291.

Fujii, R., Fukusumi, S., Hosoya, M., Kawamata, Y., Habata, Y., Hinuma, S., Sekiguchi, M., Kitada, C., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H., Sumino, Y., Fujino, M., 1999. Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regul Pept* 83, 1-10.

Fukusumi, S., Fujii, R., Hinuma, S., 2006. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 27, 1073-1086.

Hayakawa, J., Ohmichi, M., Tasaka, K., Kanda, Y., Adachi, K., Nishio, Y., Hisamoto, K., Mabuchi, S., Hinuma, S., Murata, Y., 2002. Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein. *Endocrinology* 143, 13-22.

Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., Sekiguchi, M., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H., Fujino, M., 1998. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393, 272-276.

Hurbain-Kosmath, I., Berault, A., Noel, N., Polkowska, J., Bohin, A., Jutisz, M., Leiter, E., Beamer, W., Bedigian, H., Davisson, M., 1990. Gonadotropes in a novel rat pituitary tumor cell line, RC-4B/C. Establishment and partial characterization of the cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 431-440.

Ibata, Y., Iijima, N., Kataoka, Y., Kakihara, K., Tanaka, M., Hosoya, M., Hinuma, S., 2000. Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain. *Neurosci Res* 38, 223-230.

Iijima, N., Matsumoto, Y., Yano, T., Tanaka, M., Yamamoto, T., Kakihara, K., Kataoka, Y., Tamada, Y., Matsumoto, H., Suzuki, N., Hinuma, S., Ibata, Y., 2001. A novel function of prolactin-releasing peptide in the control of growth hormone via secretion of somatostatin from the hypothalamus. *Endocrinology* 142, 3239-3243.

Jarry, H., Heuer, H., Schomburg, L., Bauer, K., 2000. Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo. *Neuroendocrinology* 71, 262-267.

Ji, L., Mochon, E., Arcinas, M., Boxer, L., 1996. CREB proteins function as positive regulators of the translocated bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem* 271, 22687-22691.

Kimura, A., Ohmichi, M., Tasaka, K., Kanda, Y., Ikegami, H., Hayakawa, J., Hisamoto, K., Morishige, K., Hinuma, S., Kurachi, H., Murata, Y., 2000. Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase. *J Biol Chem* 275, 3667-3674.

Langmead, C., Szekeres, P., Chambers, J., Ratcliffe, S., Jones, D., Hirst, W., Price, G., Herdon, H., 2000. Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br J Pharmacol* 131, 683-688.

Lawrence, C., Celsi, F., Brennand, J., Luckman, S., 2000. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci* 3, 645-646.

Lawrence, C., Ellacott, K., Luckman, S., 2002. PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology* 143, 360-367.

Maixnerová, J., Hlaváček, J., Blokesová, D., Kowalczyk, W., Elbert, T., Sanda, M., Blechová, M., Zelezná, B., Slaninová, J., Maletínská, L., 2007. Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 28, 1945-1953.

Maruyama, M., Matsumoto, H., Fujiwara, K., Kitada, C., Hinuma, S., Onda, H., Fujino, M., Inoue, K., 1999. Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain. *Endocrinology* 140, 2326-2333.

Matsumoto, H., Noguchi, J., Horikoshi, Y., Kawamata, Y., Kitada, C., Hinuma, S., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 1999. Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 321-324.

Motulsky, H., Neubig, R., 2002. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 7, Unit 7.5.

Nanzer, A., Khalaf, S., Mozid, A., Fowkes, R., Patel, M., Burrin, J., Grossman, A., Korbonits, M., 2004. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 151, 233-240.

Onaka, T., Takayanagi, Y., Leng, G., 2010. Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab* 21, 287-293.

Roland, B., Sutton, S., Wilson, S., Luo, L., Pyati, J., Huvar, R., Erlander, M., Lovenberg, T., 1999. Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 140, 5736-5745.

Rubinek, T., Hadani, M., Barkai, G., Melmed, S., Shimon, I., 2001. Prolactin (PRL)-releasing peptide stimulates PRL secretion from human fetal pituitary cultures and growth hormone release from cultured pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2826-2830.

Samson, W., Resch, Z., Murphy, T., Chang, J., 1998. Gender-biased activity of the novel prolactin releasing peptides: comparison with thyrotropin releasing hormone reveals only pharmacologic effects. *Endocrine* 9, 289-291.

Satoh, F., Smith, D., Gardiner, J., Mahmoodi, M., Murphy, K., Ghatei, M., Bloom, S., 2000. Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding

sites in the rat--evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 129, 1787-1793.

Seal, L., Small, C., Kim, M., Stanley, S., Taheri, S., Ghatei, M., Bloom, S., 2000. Prolactin releasing peptide (PrRP) stimulates luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) via a hypothalamic mechanism in male rats. *Endocrinology* 141, 1909-1912.

Spuch, C., Diz-Chaves, Y., Pérez-Tilve, D., Alvarez-Crespo, M., Mallo, F., 2007. Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo. *Endocrine* 31, 119-124.

Sun, B., Fujiwara, K., Adachi, S., Inoue, K., 2005. Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regul Pept* 126, 27-33.

Takayanagi, Y., Matsumoto, H., Nakata, M., Mera, T., Fukusumi, S., Hinuma, S., Ueta, Y., Yada, T., Leng, G., Onaka, T., 2008. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest* 118, 4014-4024.

Tashjian, A.J., Yasumura, Y., Levine, L., Sato, G., Parker, M., 1968. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* 82, 342-352.

Taylor, M., Samson, W., 2001. The prolactin releasing peptides: RF-amide peptides. *Cell Mol Life Sci* 58, 1206-1215.

Watanobe, H., Schiöth, H., Wikberg, J., Suda, T., 2000. Evaluation of the role for prolactin-releasing peptide in prolactin secretion induced by ether stress and suckling in the rat: comparison with vasoactive intestinal peptide. *Brain Res* 865, 91-96.

Figure legends

Fig. 1

Immunodetection of the PrRP receptor in Western blots of AtT20, GH3 and RC-4B/C cell lysates. Jurkat cells were used as a positive control.

Fig. 2

^{125}I -PrRP31 saturation binding to a/ AtT20, b/ GH3 and c/ RC-4B/C intact cells on plates (in all experiments, 4×10^5 cells/well were used). The cells were incubated at 25°C for 60 min with increasing concentrations of ^{125}I -PrRP31 in the absence (total binding) or presence (non-specific binding) of 10^{-5} M PrRP31. Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific from the total binding. Binding curves were plotted using non-linear regression. The figure is a representative example of at least three experiments carried out in duplicate.

Fig. 3

Characterization of PrRP receptor-induced MAPK/ERK and CREB phosphorylation. RC-4B/C cells were grown and treated as described in the Materials and Methods and stimulated with PMA or PrRP analogs for 5 min at 37°C. Subsequently, cells were lysed, and MAPK/ERK or CREB phosphorylation was determined by immunoblotting. Detection with total (unphosphorylated) MAPK/ERK or CREB antibody was performed to verify the total amount of MAPK/ERK or CREB protein. Data are the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments carried out in duplicate. The phosphorylation level in control cells was normalized to 1. Statistically significant differences to control are indicated (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Fig. 4

PrRP analog-induced PRL production by RC-4B/C cells. RC-4B/C cells were grown and treated as described in the Materials and Methods and incubated with the indicated concentrations of PrRP analogs for 1 h. Supernatants of the culture media were collected and PRL concentrations were measured by RIA assay. The results shown are representative of those obtained from three independent experiments carried out in duplicate.

Table 1.

Displacement of ^{125}I -PrRP31 binding to RC-4B/C cells by PrRP analogs

Peptide	K_i [M]
PrRP31	$(4.52 \pm 0.79) \times 10^{-9}$
PrRP20	$(3.20 \pm 1.24) \times 10^{-9}$
I-PrRP31	$(3.66 \pm 0.49) \times 10^{-9}$
PrRP13	$(4.84 \pm 2.35) \times 10^{-7}$

Mean \pm S.E.M. of three to five separate experiments.

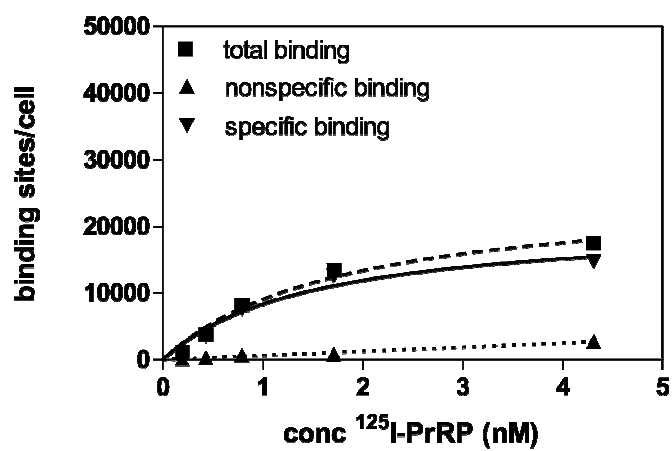
K_i was calculated using the Cheng–Prusoff equation (concentration of the radioligand was 0.1 nM and the K_d taken from saturation experiments was 4.21 nM).

Fig.1

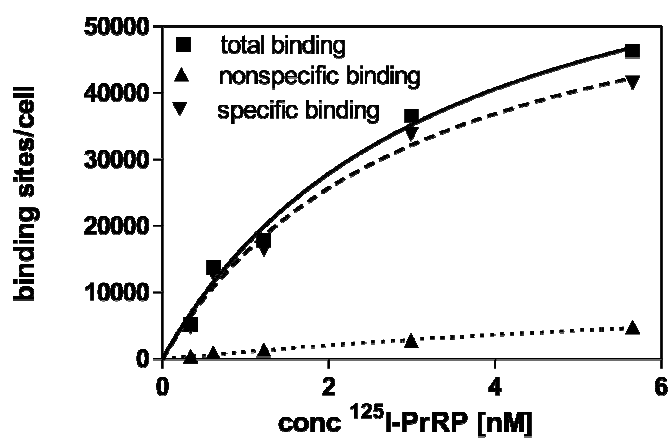


Fig. 2

a/



b/



c/

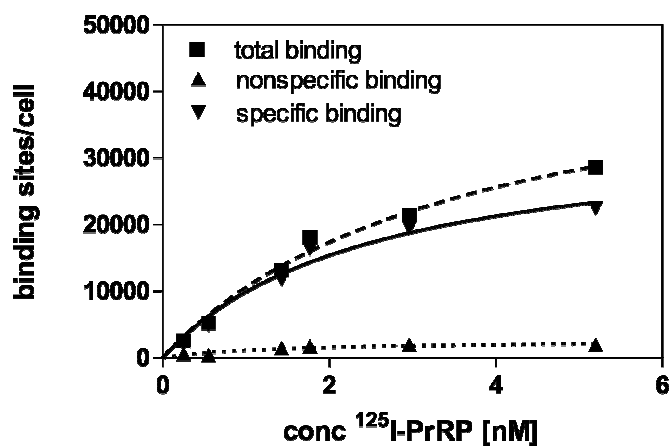


Fig. 3

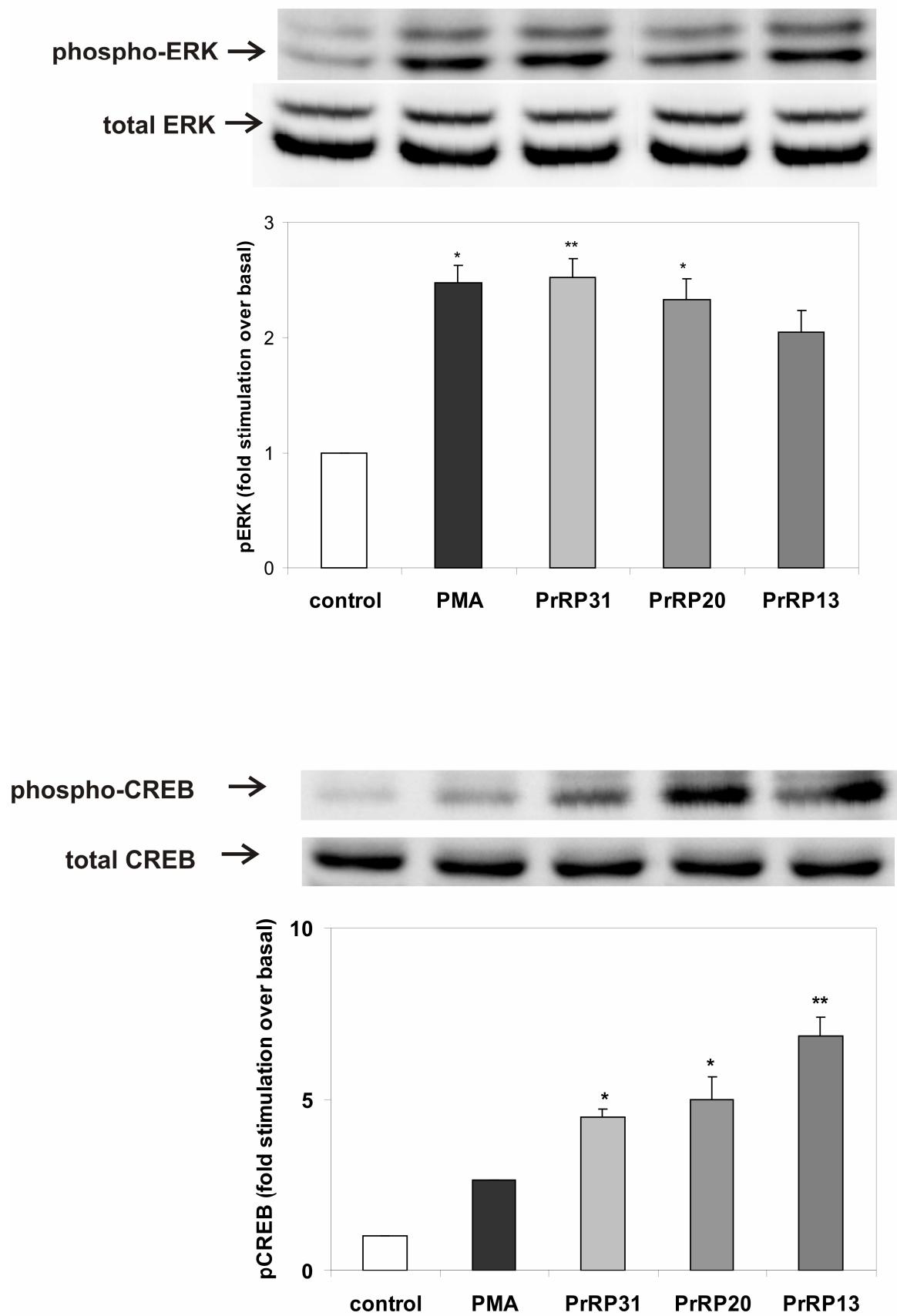
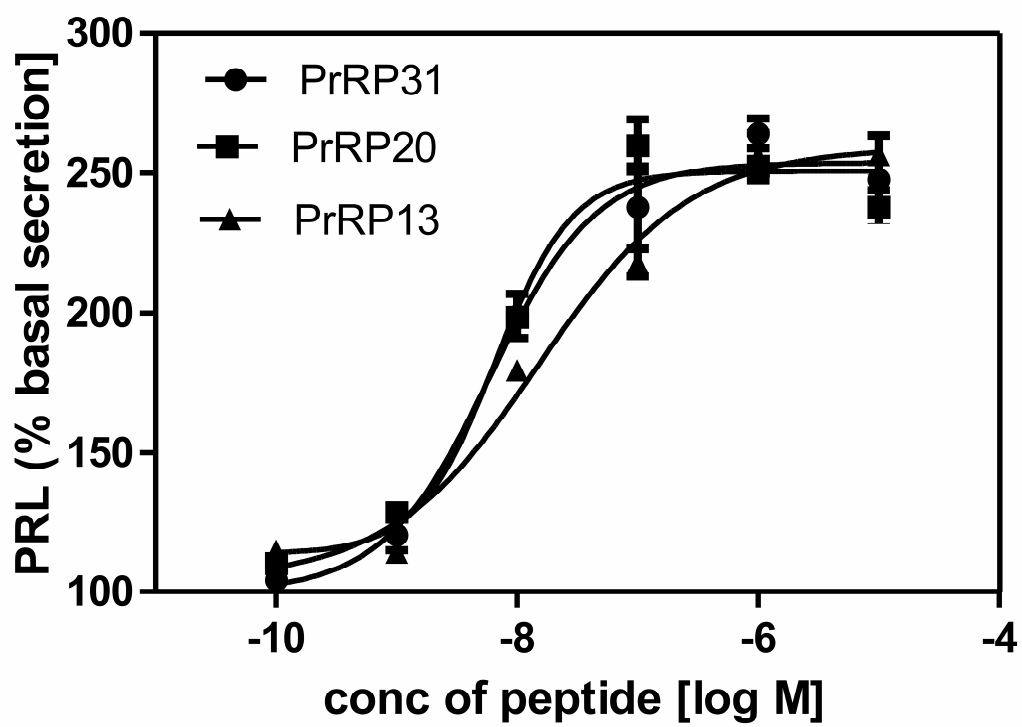


Fig. 4



**Prohlášení zájemce o nahlédnutí
do závěrečné práce absolventa studijního programu
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

[illegible]

